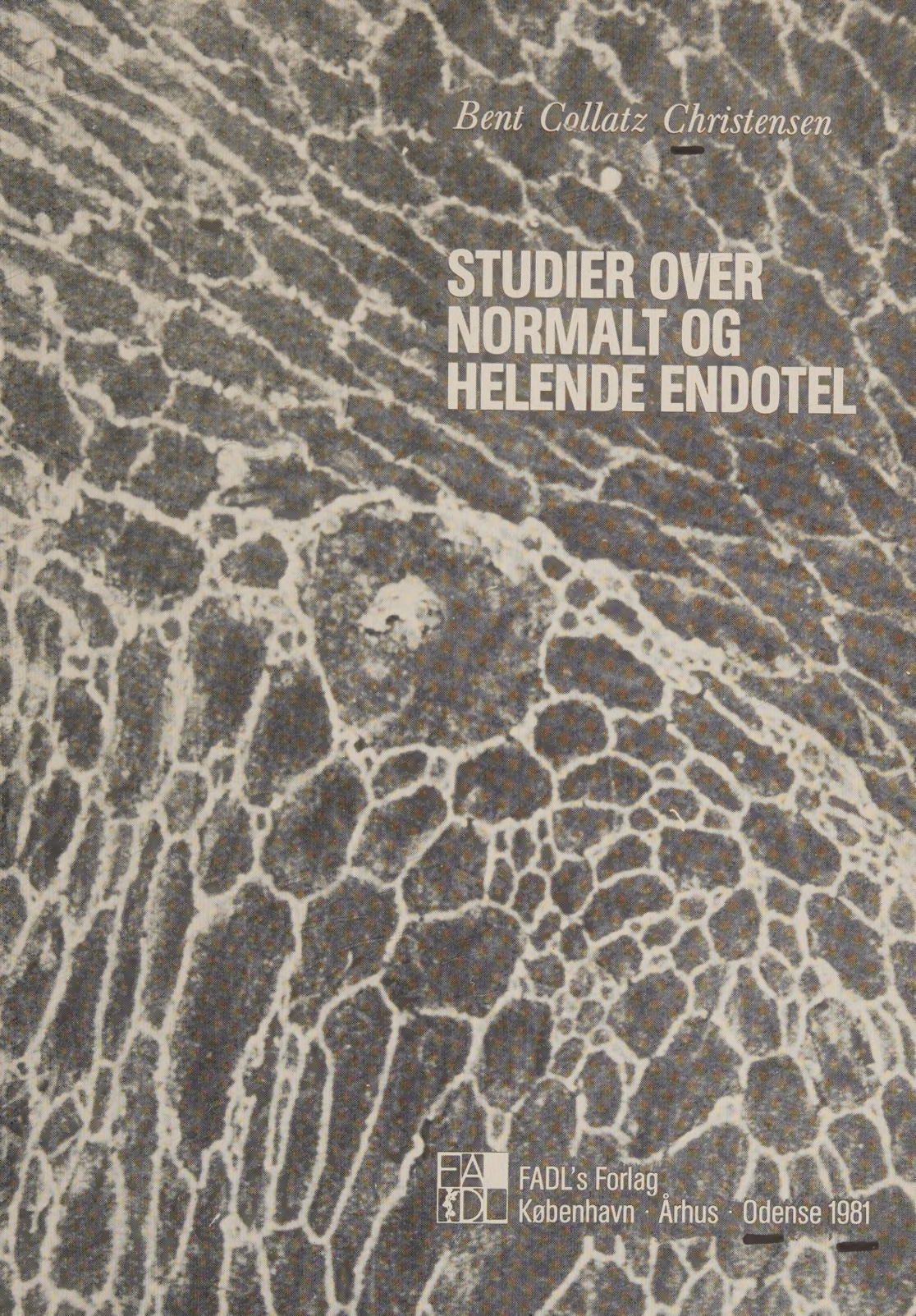




Bent Collatz Christensen

**STUDIER OVER
NORMALT OG
HELENDE ENDOTEL**



FADL's Forlag
København · Århus · Odense 1981

Forsvaret finder sted fredag den 6. februar 1981 kl. 13.30
i Store Auditorium, Patologisk Institut, J.B. Winsløvs Vej
15, Odense.

Bent Collatz Christensen

STUDIER OVER NORMALT OG HELENDE ENDOTEL

Scanning elektronmikroskopi og
transmissionselektronmikroskopi og
permeabilitetsstudier på kaninens
aorta thoracica



FADL's Forlag København · Århus · Odense 1981

Denne afhandling er den 18. august 1980 af Odense universitets
lægevidenskabelige fakultetsråd antaget til forsvar for den
medicinske doktorgrad.

Jørgen Ringsted
h.a.dec.



© Bent Collatz Christensen
FADL's Forlag 1980
ISBN 87-7437-845-7
Trykt hos Villadsen & Christensen

*Til Annelise
og Lene, Nina og Ida*

Alles Vergängliche ist nur ein Gleichnis
Goethe

Forord

De eksperimentelle arbejder, som ligger til grund for denne afhandling, er udført på Anatomisk Institut ved Odense Universitet. I samarbejde med lektor dr. med. C. Garbarsch, Medicinsk Anatomisk Institut A ved Københavns Universitet, blev sølvfarvemethoden til studie af endotelcellegrænser med Scanning elektronmikroskopet udviklet i 1969. Professor dr. med. Ib Lorenzen opfordrede mig 1970 til at anvende denne og andre morfologiske undersøgelsesmetoder på eksperimentelle forsøgsmodeller, som var indarbejdede som rutinemetoder i et forskerteam, som under hans ledelse udforskede basale problemer i eksperimentel arteriosclerose ved et tæt samarbejde mellem biokemikere, histokemikere og morfologer. Jeg blev herefter deltager i et team, som primært bestod af lektor dr. med. C. Garbarsch, lektor dr. med., cand. odont. M. E. Matthiessen, overlæge dr. med. P. Helin og cand. polyt. G. Helin. Teamet blev siden udvidet med dr. med. T. Mørk Hansen, cand. med. R. Mantorpe og mag. scient. B. Kofod.

Jeg har haft et tæt samarbejde med min ven lektor dr. med. C. Garbarsch på Københavns Universitet og ved Odense Universitet med lektor cand. med. I. Tkocz, lektor cand. med. J. Chemnitz og med cand. scient. O. Blaabjerg, Afdeling for Klinisk Kemi, Odense Sygehus.

En særlig tak retter jeg til professor dr. med. Ib Lorenzen, Hvidovre Hospital, afsnit 233, for hans uselviske indsats som teamets koordinator. Han har ydet stor opmuntring til mine studier ved at gå ind for, at resultater af morfologiske studier er komplementære til biokemiske og patologiske forandringer i karvæggen, som har åbnet muligheder for tolkning af basale problemer i atherogenesen i humanpatologisk perspektiv. Professor F. Bierring, Anatomisk Institut, Odense Universitet, har ydet mig vejledning ved udnyt-

telsen af instituttets avancerede udstyr til ultrastrukturelle studier og opmuntret mit arbejde ved interesse og påskønnelse. Lektor cand. med. J. Chemnitz har med sit forskertalent og brillante evne for beherskelse af metoderne været en uvurderlig makker i alle faser af de projekter, vi har gennemført sammen.

En speciel tak rettes til fru R. Lønstrup for assistance ved det eksperimentelle arbejde og præparatfremstilling. Histolaboranterne i EM-laboratoriet frk. U. Hauschild-Ottesen, fru I. Holst og frk. I. M. Rasmussen, fru D. Jensen og frk. J. Levinsen i LM-laboratoriet og i fotoafdelingen fotograferne E. Panton og fru V. Sylvest Frederiksen takkes for dygtigt udført præcisionsarbejde. Dyrestaldens personale takkes for omsorg for dyrene; en særlig tak rettes hermed til lederen af dyrestalden ved Odense Universitet, lektor dr. med. vet. P. Svendsen og laboratorieoverassistent Å. Kristensen. Forvalteren og fru Madsen ved Horsens Fjerkræslagteri takkes for adgang til rigeligt materiale af aortavæv fra kaniner til indøvning af Häutchen-teknik. Bibliotekar frk. Randi Botnen og personalet ved Odense Universitetsbibliotek takkes for utrættelig hjælp ved udarbejdelse af litteraturlisten.

Sekretær ved Anatomisk Institut fru E. Berg takkes for effektiv og usvigelig præcis arbejdsindsats ved udformning af de engelsksprogede artikler og ved renskrift af tesen.

Jeg har modtaget støtte fra Foreningen til Hjertesygdommenes Bekæmpelse og fra Martha og Erik Scheibels Fond.

Bent Collatz Christensen

INDHOLDSFORTEGNELSE

<u>Introduktion: aspekter</u>	3
-------------------------------------	---

Kapitel I

Scanning elektronmikroskopi (SEM) af endotelet i den normale aorta thoracica hos kaninen

Sølvfarvning af endotel	7
Præparation af væv til SEM	8
Sølvfarvning af endotel kombineret med SEM	10
Materiale og metoder (I, II)	11
<u>Observationer</u>	13
- Det normale sølvlinjemønster og intimale grov- folder	13
- Artefacts	14
- SEM sammenlignet med lysmikroskopi og transmis- sions-elektronmikroskopi (TEM)	15
<u>Diskussion</u>	15
Præparationsmetoder og artefacts	15
Observationerne sammenholdt med andre forfatteres dokumentationer	16
Grovfolder i intima og "brolignende" strukturer ..	16
Cellegrænser med og uden sølvimprægnering	18
Celleoverfladen	20
Metodernes anvendelighed og sammenlignelighed	21
<u>Konklusion</u>	22

Kapitel II

SEM og overfladelysmikroskopi af aorta thoracica efter ballonlæsion og toksiske doser noradrenalin

Forsøgsmodellernes patofysiologiske relevans	23
- Særlige helingsbetingelser for karvæggens binde- væv	23
- Lokaliserende faktorer i atherogenesen	24

- Eksperimentel arteriosclerose	24
- Forsøgsmodeller baseret på fysisk beskadigelse .	25
- Fibromyoelastisk hyperplasi	26
- Ballonmodellens og noradrenalinmodellens patogene-	
netiske relevans	27
<u>Ballonlæsion af aorta thoracica (III)</u>	
Materiale og metoder	27
<u>Endotelets heling efter ballonlæsion belyst ved</u>	
<u>SEM og overfladelysmikroskopi</u>	
<u>Observationer</u>	28
Lysmikroskopisk oversigt	29
Denuderet flade	30
Hexagonale mønstre	30
"Foam-like patterns"	30
Polariserede cellemønstre	31
Grænsezoner mellem endotel og "foam-like patterns"	31
Grænsezoner mellem endotel og denuderet flade	31
Endoteliale kæmpeceller	31
- Diskrepanser mellem SEM og overfladelysmikrosko-	
pi	32
<u>Diskussion</u>	32
- Sammenligning med andre forfatteres observatio-	
ner med sølvfarvning	32
Hexagonale mønstre	33
"Foam-like patterns"	35
Polariserede cellemønstre	35
De skarpe grænsezoner	36
Kæmpeceller med multiple kerner	36
Diskrepanser mellem SEM og lysmikroskopi	37
Endotelets oprindelse og hastigheden for reendote-	
lialisering	38
<u>Konklusion</u>	38
Koncept af helingen af intima efter ballonlæsion	
baseret på nærværende studier (III, VI, "2", VII-	
VIII)	40

<u>Noradrenalinlæsion af aorta thoracica (IV, V)</u>	
Materiale og metoder	41
<u>Endotelets reaktion på noradrenalin i toksiske doser belyst ved SEM og lysmikroskopi</u>	
<u>Observationer</u>	42
- Farmakodynamisk effekt og autopsifund	42
Kvalitative forandringer (IV, V)	43
Hexagonalt endotel	43
Sølvbindende endotelceller (EC)	44
Uklassificerbare forandringer	44
Transmissions-lysmikroskopi	44
Semikvantitative analyser (V)	45
Hexagonalt endotel	45
Sølvbindende celler	45
Intimafortykkelse og medianekroser	46
<u>Diskussion</u>	46
- Adrenalins og noradrenalins virkning på arterier	46
- Endotelets reaktion på katekolaminer	47
Hexagonalt endotel	48
Sølvbindende EC	48
De semikvantitative analyser	50
Forskelle mellem noradrenalinlæsion og ballonlæsion	51
<u>Konklusion</u>	52
Valg af forsøgsmodel til følgende studier	53

Kapitel III

<u>Endotelets rolle i helingen af aorta efter ballonlæsion</u>	
Vitalfarvning med Evans blue korreleret med overfladelysmikroskopi og med transmissions-elektronmikroskopi (TEM)	
<u>Introduktion</u>	54
1. Endotelbeskadigelse og proliferation af SMC	
En atherogeneseteori ("den myogene teori")	54

Reendotelialisering	55
SMC's proliferative respons	56
Samtidige reaktioner i helingsforløbet: reendote- lialisering og proliferation af SMC	56
2. Vitalfarvning af aorta med Evans blue	57
- Passagevejen gennem endotel for makromolekyler .	59
- Permeabiliteten af en helende intima	59
- Den intimale barrieres komponenter	59
3. Formål med undersøgelserne	60
Materiale og metoder (VI, VII-VIII)	61
<u>Observationer</u>	65
I. Lysmikroskopi korreleret med vitalfarvning	
Vitalfarvning med Evans blue (VI, VII-VIII)	65
Overfladelysmikroskopi (VI)	66
Fluorescensmikroskopi (VI, VII-VIII)	68
Transmissions-lysmikroskopi (VI)	69
II. TEM korreleret med vitalfarvning (VII-VIII)	
Kontrolmaterialet og præparationsmetoder	69
Forsøgsmaterialet (VII-VIII)	70
1. Initiale læsion, inflammatoriske og reparative respons	70
2. Reendotelialisering, vitalfarvning og subendo- telialt bindevæv	71
3. Reendotelialisering, struktur og organisering af det dybere neointimale bindevæv	74
A. Forskelle i bindevævs kvalitet	74
B. Semikvantitering af forskelle i bindevævs kva- litet	76
<u>Diskussion</u>	76
Lysmikroskopistudier korreleret med vitalfarvning VI	76
<u>Konklusion</u>	78
TEM korreleret med vitalfarvning (VII-VIII)	78
Fejlkilder og metodernes begrænsning	78
Initiale inflammatoriske og reparative respons ...	79

Endotelcellers og subendotelialt bindevævs rolle i heling og permeabilitet	79
Reendotelialisering og lamellering af det neointi- male bindevæv	84
Den intimale barriere og organisering af det neo- intimale bindevæv	85
Ultrastrukturelle forskelle mellem neointima dæk- ket af endotel og pseudoendotel	86
<u>Konklusion og tese</u>	89
<u>Perspektiver</u>	91

RESUMÉ

Kapitel I	93
Kapitel II	95
Kapitel III	99
Perspektiver	101

<u>REFERENCER</u>	103
-------------------------	-----

De arbejder, der danner grundlag for denne afhandling, er følgende:

- I. Garbarsch, C. & Collatz Christensen, B.: Scanning electron microscopy of aortic endothelial cell boundaries after staining with silver nitrate. *Angiologica* 7: 365-373, 1970.
- II. Collatz Christensen, B. & Garbarsch, C.: A scanning electron microscopic (SEM) study on the endothelium of the normal rabbit aorta. *Angiologica* 9: 15-26, 1972.
- III. Collatz Christensen, B. & Garbarsch, C.: Repair in arterial tissue. A scanning electron microscopic (SEM) and light microscopic study on the endothelium of rabbit thoracic aorta following a single dilatation injury. *Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat.* 360: 93-106, 1973.
- IV. Collatz Christensen, B.: Repair in arterial tissue. A scanning electron microscopic (SEM) and light microscopic study on the endothelium of the rabbit thoracic aorta following noradrenaline in toxic doses. *Virchows Arch. A. Path. Anat. and Histol.* 363: 33-46, 1974.
- V. Collatz Christensen, B. & Tkocz, I.: Repair in arterial tissue. A semiquantitative scanning-electron-microscopic and light-microscopic study on the effects of toxic doses of noradrenaline on the endothelium of the rabbit thoracic aorta. *Blood vessels* 14: 116-127, 1977.
- VI. Collatz Christensen, B., Chemnitz, J., Tkocz, I. and Blaabjerg, O.: Repair in arterial tissue. The role of endothelium in the permeability of a healing intimal surface. Vital staining with Evans blue and silver-staining of the aortic intima after a single dilatation trauma. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A*, 85: 297-310, 1977.
- VII. Collatz Christensen, B., Chemnitz, J., Tkocz, I. and Kim, C.M.: Repair in arterial tissue. 1. Endothelial regrowth, subendothelial tissue changes and permea-

bility in the healing rabbit thoracic aorta. Antaget til publikation i Acta path. microbiol. scand. Sect. A, 87: 265-273, 1979.

- VIII. Collatz Christensen, B., Chemnitz, J., Tkocz, I. and Kim, C.M.: Repair in arterial tissue. 2. Connective tissue changes following an embolectomy catheter lesion. The importance of the endothelial cells to repair and regeneration. Antaget til publikation i Acta path. microbiol. scand. Sect. A, 87: 275-283, 1979.

Endvidere er følgende af forfatterens arbejder omtalt i afhandlingen:

1. Collatz Christensen, B., Chemnitz, J. & Tkocz, I.: Repair in arterial tissue. Electron microscopy of Evans blue vital stained embolectomy catheter lesion of the rabbit thoracic aorta. Acta path. microbiol. scand. Sect. A. 84: 355-357, 1976.
2. Chemnitz, J., Collatz Christensen, B. & Tkocz, I.: En face organ cultures of rabbit aortic segments after a single dilatation trauma in vivo. A new model in the study of endothelial regeneration. Virchows Arch. A Path. Anat. and Histol. 375: 257-262, 1977.

INTRODUKTION

Aspekter

Formålet med det foreliggende arbejde er beskrivelse af det normale aortaendotels overflademorfologi og endotelets reaktion på beskadigelse samt studie af korrelerede forandringer i endotel og bindevæv under helingen af en mekanisk læsion.

Arbejdets relevans for human patologi er begrundet i, at endotelbeskadigelse og inflammatoriske og reparative processer spiller afgørende roller i udviklingen af den humane arteriosclerose. Virchow (1856) beskrev arteriosclerosens tidlige forandring som fokal øgning af intercellularsubstansen i intima med ledsagende mesenchymal reaktion omfattende cellulær proliferation; degenerative forandringer, inkl. fedtakkumulation var sekundære fænomener. Virchow påpegede tilmed, at mekaniske faktorer i forbindelse med blodstrømmen havde betydning for læsionernes lokalisering.

Virchows hypotese om uspecifik beskadigelse som initiale forandring ved arteriosclerose trådte i lang tid i baggrunden under den eksperimentelle arterioscleroses første æra i begyndelsen af dette århundrede. Mens Josue's beskrivelse af adrenalininduceret arteriosclerose (Josue 1903, 1905) tabte interessen, bl.a. fordi læsionen var lokaliseret til media og ikke implicerede lipider (Braun 1907, Lange 1924), gik det modsat forsøg, som baseredes på cholesterolfodring. Siden Anitschkow (1913) ved cholesterolfodring hos kaniner udløste forandringer, som lignede human arteriosclerose, har ændringer i serumlipider og i lipidmetabolismen været tillagt primær betydning i udviklingen af human arteriosclerose (Hueper 1956, Adams 1973). Andre forfattere har lagt vægt på, at karvæggen reagerer ensartet på forskellige skadelige påvirkninger, og at proliferative forandringer optræder i forbindelse med

hypercholesterolemi før lipider ophobes (Gillman & Hathorn 1957, Moon 1959, Lorenzen 1963b, Thomas et al. 1968, Imai et al. 1970). Ved excessiv hyperlipedemi udgør lipiderne i sig selv en vævsbeskadigende faktor medførende deendotelialisering, og lipidernes tilstedeværelse i vævet modificerer forløbet af de reparative processer (Ross & Harker 1976).

Gillman & Hathorn (1957) sammenlignede histologisk og biokemisk helingsprocesserne i rotters arterier efter indgift af toksiske doser vitamin D med helingsprocesserne i hudsår og fandt overensstemmelse i forandringerne sekvens, men langsommere forløb af reaktionerne i arterielt væv. Moon (1959) støtter denne opfattelse med dokumentation af, at de tidlige forandringer ved arteriosclerose er de samme som helingsprocesserne i andet bindevæv.

Lorenzen og hans gruppe har med histologiske, histokemiske og kemiske analyser af kaniners aorta thoracica studeret bindevævs makromolekyler, især glykosaminoglykaner, samt kollagen og elastin efter forskellige skadende påvirkninger: Intravenøs injektion af katekolaminer (Lorenzen 1959, Lorenzen 1963a og b, Helin et al. 1970a), injektion af thyroideahormon (Lorenzen 1963b), udsættelse af forsøgsdyrene for systemisk hypoxi (Helin & Lorenzen 1969, Garbarsch et al. 1969, Helin et al. 1969, Helin et al. 1970b, 1974 og 1975), engangstraume med ballonkateter (Helin et al. 1971a og b, Lindy et al. 1972, Garbarsch 1973a og b). Karvæggens reaktion efter eksperimentel beskadigelse ved så forskellige metoder viste sig at være ret ensartet af typen uspecifikke inflammatoriske og reparative reaktioner af samme type som sårhelingsprocesser og dannelse af granulationsvæv (Lorenzen 1973).

Stemerman & Ross (1972) fremkaldte med ballonlæsion hos aber en reparativ læsion ("fibromysculoelastic lesion") af udseende som fibrous plaque og påviser, at glatte muskelceller (smooth muscle cells, forkortet: SMC) spiller en hovedrolle i forbindelse med proliferation og dannelse af glyko-

saminoglykaner, collagen og elastin. I senere arbejder (Ross & Glomset 1973 og 1974, Ross & Harker 1976) fremsættes den "myogene teori" (jf. p. 54), hvorefter SMC's proliferative respons er en nøglebegivenhed i atherogenesen.

Endotelcellernes (EC's) betydning i atherogenesen er sat i forbindelse med indflydelsen af lokaliserende faktorer sammenhængende bl.a. med hemodynamisk stress, fokal EC-beskadigelse og øget turn over (jf. p. 24). Ross & Glomset (1973) efterlyser mere eksakt information om arterielle EC's funktionelle egenskaber, permeabilitetsegenskaber, turnover og evne til dannelse af ekstracellulære komponenter. I senere arbejder, hvor mekanisk læsion kombineres med hypercholesterolemi (Ross & Glomset 1974, Ross & Harker 1976) fastslås, at EC påvirker SMC's reaktion ved at danne barriere mod indtrængen af plasmaprotein og lipoprotein. Også i den normale arterie er barrierefunktionen EC's vigtigste funktion, og den vigtigste effekt af hemodynamiske og andre EC-beskadigende faktorer er nedsættelse af barrierefunktionen (Ross & Glomset 1973). - En modifikation af denne hypotese om EC's rolle kan udledes at dette arbejde (jf. p. 91).

Nærværende arbejde blev påbegyndt 1969 på et tidspunkt, hvor det arterielle bindevævs reaktion på forskellige beskadigelser undersøgt af samme gruppe undersøgere var vidt fremskredet (se ovenfor p. 4). Scanning elektronmikroskopi var på samme tidspunkt netop taget i brug ved studie af karvæv (Frost et al. 1968). Metoden havde i Shimamoto et al.'s hænder givet et nyt billede af den intinale overflades normalanatomi med detaljer i relieffet, som ikke var kendte i lysmikroskopiske en face studier af intima (Shimamoto et al. 1969a og b, Sunaga et al. 1969a og b, jf. p. 16).

Efter at det lykkedes at forene den klassiske metode til sølvfarvning af EC-mønsteret med præparation af væv til SEM (I, II, jf. p. 10) blev det besluttet at analysere den

normale aorta thoracica hos kaninen (I, II) og endotelets reaktion efter ballonlæsion og noradrenalinlæsion (III, IV og V). Videreføring af arbejdet til at omfatte permeabilitetsstudier (I og VI) og korrelerede transmissions elektronmikroskopiske og permeabilitetsstudier (I, VII og VIII) blev planlagt i senere periode på basis af problemformulering bygget på informationer indhøstet ved en face studier med SEM og overfladelysmikroskopi (I, II, III, IV og V).

De enkelte arbejders færdiggørelse har været udstrakt over et langt tidsrum. Forudsætninger for problemformulering og diskussion af observationer i de enkelte arbejder har ændret sig i forbindelse med den generelle udvikling i eksperimentel arteriosclerose og i forbindelse med erfaringer baseret på egne fortsatte undersøgelser..

Arbejdet præsenteres derfor som en helhed med dokumentation, kritik og beskrivelse af metoder og observationer og diskussion af data i et nutidigt samlet perspektiv.

KAPITEL I

Scanning elektronmikroskopi (SEM) af endotelet i den normale aorta thoracica hos kaninen

Sølvfarvning af endotel

Fremstilling af sølvlinjemønster i endotel ved hjælp af sølvnitrat er en mere end hundrede år gammel metode (oversigt: Benninghoff 1930, Altschul 1954, Sinapius 1956, Florey et al. 1959). I nyere tid er metoden anvendt ekstensivt på studiet af endotel i store kar (Efskind 1941, Sinapius 1952 og 1956, Florey et al. 1959, Cotton & Wartman 1961, Gottlob & Hoff 1967) og sammenlignet med andre metoder til fremstilling af cellegrænser (Lautsch et al. 1953, Sinapius 1956, Florey et al. 1959).

Sølvfarvningen beror på, at sølvionerne med klorioner i vævet danner sølvklorid, som ved lysets påvirkning reduceres til metallisk sølv (Sinapius 1956). Udfældningerne består ifølge samme forf. formentlig af kolloidalt metallisk sølv. Klorionernes betydning for reaktionen blev fastslået af Achard & Aynaud (1906 og 1907), som viser, at reaktionen udebliver efter bortskylning af klorid, men genindtræder efter reklorering af vævet. Årsagerne til aftegning af sølvlinjenettet er ikke afklaret. Achard & Aynaud (1907) formodede, at høj klorionkoncentration i cellernes grænsezoner var forklaringen, mens Sinapius (1956), der betragtede endotelet som et synplasmium, formodede, at der var fokalt øget absorbtionsevne i endotelfladen svarende til sølvlinjemønsteret. Florey et al. (1959) anvendte især sølvfarvning baseret på osmiumbedampning i 10 minutter efterfulgt af få sekunders påvirkning med sølvnitrat. Med transmissions-elektronmikroskopi (TEM) viste forff., at sølvet blev udfældet oven på overfladen omkring cellernes grænsezoner som ca. 1 μm brede udfældninger, men også i mindre omfang diffust på cellernes overflader, i cellerne og under disse som fine uens store korn. Samme forff. beviste, at et linjesystem af samme udseende som sølvlinjenettet kunne fremkaldes uafhængigt af klorioners tilstedeværelse med andre metoder (Florey et al. 1959). Sølvudfældningens prævalens til endotelcellers grænsezoner er søgt forklaret ved øget klorionkoncentration i

endotelcellers grænsezoner (Achard & Aynaud 1907), øget reduktionsevne i disse zoner, øget absorptionsevne for kolloidalt metallisk sølv i disse zoner (Sinapius 1956) eller "polyanion binding sites" (Gottlob & Hoff 1967).

Præparation af væv til scanning elektronmikroskopi (SEM)

Ved den første internationale atherosclerosekongres i Wien 1977 blev proceduren for præparation af karvæv til SEM indgående drøftet. Weber (1977), Stachelberger et al. (1977) og Gerrity (1977) fremhævede det uønskelige i anvendelse af ensartet præparations-teknik, som alle kunne bruge på karvæv, men påpegede vigtigheden af at fastholde en standardisering inden for det enkelte laboratorium, således at observationerne kan sammenlignes og evalueres fra dyr til dyr og fra eksperiment til eksperiment.

Proceduren omfatter følgende trin: fiksering, dehydrering, tørring, coating og studie af vævet i SEM-søjlels vakuum (oversigt: Bowyer 1977). Ved fiksering er perfusionsfiksering, når den er mulig, at foretrække (Still & Dennison 1974, Gertz et al. 1975, Swinehart et al. 1976, Clark & Glagov 1976, Bowyer 1977) og lang fikseringstid anbefales af nogle forff. (Bowyer et al. 1977, Bowyer 1977). Det er vigtigt, at endotelcellerne (EC) er levende på tidspunktet for kontakt med fiksativet, og forudgående skylning af karbanen med (flushing medium) iltmættet Krebs Ringer bicarbonatopløsning, 37° C, anbefales (Gerrity 1977). Andre væsker kan anbefales, isotonisk buffet glucose (Bowyer et al. 1977, Bowyer 1977), eller fysiologisk saltvand, iltmættet, hepariniseret, 37° C, tilsat 1% procain (Porter et al. 1972).

Som fiksativ anses ren glutaraldehyd alene eller kombineret med formaldehyd for gunstigt, efterfulgt af postfiksering af lipider med OsO_4 (Stachelberger et al. 1977). Det er uvist, om den effektive osmolalitet af fikseringsvæsken kun tildeles denne ved bufferopløsningen eller ved buffer og fiksativ tilsammen, men mange anbefaler hyperosmotiske fiksativer med bufferens osmolalitet som kritisk komponent (Gerrity 1977, Bowyer 1977). Cacodylatbuf-

fer, veronal og triethanolamine er gunstigere for præservering af cellemembraner end fosfatbuffere, og tilsætning af Ca^{++} og Mg^{++} anbefales af hensyn til præservation af membranlipider (Stachelberger et al. 1977).

Dehydrering og tørring kan baseres på fysiske og kemiske metoder (monografier og oversigter: Boyde & Wood 1969, Porter et al. 1972, Boyde 1972, Boyde & Ecklin 1973, Nemanic 1972, Lewis & Nemanic 1973). Fysiske dehydreringsmetoder er belastet med læsion af vævet fremkaldt af overfladespændingskræfter, når interfasen luft-væske passerer gennem vævet. Ved lufttørring er belastningen hårdest ved tørring fra vand (iflg. Anderson (1951) 1 tons/kvadrattomme), men væsentligt ringere ved tørring fra acetone eller alkohol (Anderson 1951, Porter et al. 1972, Humphrey 1975). Frysetørring fra destilleret vand eliminerer overfladespændingskræfter, men indebærer risiko for læsion af vævet ved iskrystaller, hvilket kan elimineres ved dehydrering med flygtige væsker (Humphrey 1975). Critical point drying (CPD) er den simpleste og mest pålidelige metode (Humphrey 1975, Stachelberger et al. 1977) og har ifølge Porter et al. (1972) vist sig bedst egnet til at præservere finstrukturer som mikrovilli, lamellipodier, filopodier og zeiotiske vesikler.

En illustration på, at forsøgets formål og vævets art er afgørende for valg af præparationsmetode (jf. Gerrity 1977, Stachelberger et al. 1977) er brugen af direkte lufttørring uden lipid ekstraktionsmidler som optimale præservering af fedtlæsioner i aorta (Davies et al. 1976, Goode et al. 1977, Bowyer et al. 1977). Coatning af vævet med et 300 Å tykt lag kul eller tungt metal nedsætter vævets vulnerabilitet for elektronstrålen, øger antallet af sekundære elektroner og giver større opløsning, kontrast og dybdeskarphe d i billedet. Coatning kan opnås ved vakuum evaporation eller ved sputtering; det sidste foretrækkes af Gerrity (1977) og Stachelberger et al. (1977). Mounting gøres bedst med ledende pasta (Stachelberger et al. 1977).

Sølvfarvning af endotel kombineret med scanning elektronmikroskopi
 Præparation til SEM af sølvlinjemønsteret fremstillet på ufikseret væv med sølvnitrat efter klassisk metode viste sig at være enkel og reproducerbar (I, II). Metoden introduceres af Garbarsch & Collatz Christensen 1970 (I) og blev standardiseret i et følgende arbejde 1972 (II) og er anvendt uændret i de følgende forsøg (III, IV, V).

Geissinger (1972) anvender en meget lignende metode og demonstrerer, hvorledes sølvfarvede præparater anvendt til lysmikroskopi kan repræpareres og studeres ved SEM. De Bruijn et al. (1974) introducerer en sølvfarvningsmetode baseret på sølvproteinat og gennemprøver sølvfarvningsmetodikken a.m. Sinapius (1956) og vor metode baseret på farvning med sølvnitrat (I, II). De Bruijn et al. (1974) foretager ekstensive studier af proceduretrin og analyserer sølvudfældningen bl.a. med TEM og X-ray analyse. Med sølvproteinat opnåedes en mere selektiv sølvudfældning i cellernes grænsezoner, men det forblev uopklaret, hvilken substans i EC's apikale rum, der blev farvet med sølvproteinat, eller alternativt, hvilken mekanisme knyttet til fikseringsproceduren, som var bestemmende for, at sølvproteinat koncentrerer på EC-grænserne og ikke diffust på EC-overfladen. Davies & Bowyer (1975), Reidy & Bowyer (1977 a og b), Goode et al. (1977), Bowyer et al. (1977) og Bowyer (1977) anvender en præparationsmetode, som meget ligner metoden i nærværende studier (II, III, IV, V). Bannister et al. (1975) anvendte sølvfarvning efter Geissingers metode (Geissinger 1972) og anfægter vor tolkning af intimafoldernes relief (se nedenfor p. 18).

SEM kombineret med sølvfarvning har yderligere vist sin værdi som en sikker metode til studiet af endotelfladens integritet (Reidy & Bowyer 1977a, Bowyer et al. 1977, Bowyer 1977). Ved eksposition af EC for endotoxin (Reidy & Bowyer 1977 b), noradrenalin (IV, V) og kolesterol (Davies et al. 1976, Goode et al. 1977) har total sølvfarvning af isolerede EC rejst problemer i tolkning af EC's tidlige reaktion på beskadigelse og ændrede

permeabilitetsegenskaber i forbindelse med beskadigelse og reparation. Forsøgsdyrs udsættelse for uspecifikke stresspåvirkninger synes at spille en rolle for optræden af argyrofile EC (Bowyer et al. 1977, conf. p. 50).

Materiale og metoder (I, II)

Materialet omfattede 42 hankaniner af dansk landrace, 2-3 kg legemsvægt.

Perfusionsprocedure.

I første forsøg (I) perfunderes aorta hos 14 dyr ved 100 mm Hg gennem glaskanyler i venstre ventrikel. I andet forsøg (II) anvendes på 28 dyr en perfusionsteknik, der er fulgt i alle senere forsøg (III, IV, V, VI, VII-VIII). I generel anæstesi, nembutal/propanidid intravenøst i ørevene, introduceres polyetylen kateter i a. carotis communis sin. og forbindes med intravenøst infusions-sæt. Gennem sternotomi sættes klemme på hjertekarstammen, og begge aa. femorales overskæres ved incision i ingven.

Perfusionssølvfarvning *

5% glukose (stuetemperatur, pH 7,4, 250 mOsm) i 30 sek., sølvnitrat 0,25% (stuetemp., pH 5,3, 30 mOsm) i 30 sek., (i første forsøg (I) dog 60 sek.), 5% glukose i 30 sek.

Perfusionsfiksering

Fiksationsmediet i første forsøg (I), 14 dyr, og hos 2 dyr i andet forsøg (II) var 4% neutral buffet formalin (stuetemp., pH 7,2, mOsm ikke målelig). I andet forsøg (II), 26 dyr: 2,5% glutaraldehyd i 0,1 M cacodylatbuffer (stuetemp., pH 7,2, 350 mOsm). Fikseringstid 15 min., væskeforbrug 250-300 ml.

* pH bestemmelse og bestemmelse af osmolalitet er foretaget på rekonstruerede væsker i 1979.

Perfusionstryk

Perfusionsflasken var hævet 1,20 m over bordet. Ikke publicerede observationer ved pilotforsøg i forbindelse med noradrenalin-forsøgene (IV) viste, at perfusionstrykket med flasken hævet 1,20 m var 80 mm Hg. I løbet af fikseringsperioden med infusion af fiksativ steg trykket til ca. 120 mm Hg formentlig p.g.a. øget stivhed af vævet i forbindelse med fikseringen, nedsat elasticitet og øget modstand mod infusionen.

Lyseksposition

Vævet udsættes for sollys eller kunstigt lys et par minutter, indtil intima antager chokoladebrun farve,

Immersionsfiksering

I første forsøg excideres rektangulære stykker af aorta thoracica fra 14 dyr og immersionsfikseres i neutral 4% buffet formalin i 24 timer. I andet forsøg (II) excideres fra 28 dyr 5 mm lange anulære segmenter fra aorta thoracica, fra 26 af disse immersionsfikseres i 18 timer i 2,5% glutaraldehyd i 0,1 M cacodylatbuffer, pH 7,2, og fra 2 dyr fikseres i buffet 4% formalin som ovenfor.

Dehydrering, coatning og montering

Efter skylning i destilleret vand foretages dehydrering i acetone i stigende koncentrationer, og vævet lufttørres i 2 dage beskyttet mod støv. Aortacylindrene deles i to halvdele og monteres på kobbercylindre med sølvpasta. Coatning med kul og guld foretages i vakuumevaporator. Præparaterne studeres i JSM-2 scanning elektronmikroskop (JEOL) ved 25 KV.

I første forsøg (I) præpareres yderligere væv til overfladelysmikroskopi af wholemount præparater. Til lysmikroskopi-snit farvet med metylenblåt skæres halvtynde snit fra blokke postfikseret i OsO_4 i cacodylatbuffer, pH 7,2 og indlejret i araldit. Fra samme vævsblokke fremstilles enkelte snit til TEM.

Observationer

Alle præparater viste et markant mønster af ca. 12 μm brede grovfolder arrangeret longitudinelt i forhold til karrets længdeakse (I: fig. 2, fig. 3 og fig. 4. II: fig. 1, fig. 2, fig. 3b, fig. 4 og fig. 5). Folderne kunne variere i højde og bredde, forgreninger forekom, og der var konvergens down-stream mod åbningerne af intercostalarterierne (ica) vis a vis den skarpkantede flowdivider på ica-åbningens distale kant. Grovfolderne svarede til de foldninger, som i tværsnit var synlige ved præparatets rand som foldninger i membrana elastica interna (II, fig. 3b).

EC og subendotelialt væv dækkede disse grovfolder som et yderst tyndt lag. Sølvfarvede præparater fra 38 dyr viste aflange rombiske felter, repræsenterende EC med svagt antydende ovale kerner, aftegnet af siksak forløbende sølvlinjer (I: fig. 2, fig. 3, fig. 4, fig. 5. II: fig. 1, fig. 4a og c). Mønsteret af sølvlinjer bestod i eleverede ca. 1 μm brede sølvlinjer, som viste regelmæssigt optrædende nodøse fortykkelser på de punkter, hvor siksaklinjerne ændrede retning (II: fig. 1b). Ved stor forstørrelse var de opbygget af en kornet porøs masse, som særligt på mødestederne for sølvlinjerne dannede voluminøse aggregater (I: fig. 6). Endotelcellerne, repræsenteret af de aflange rombiske felter, og de svagt antydende ovale kerner var orienteret i en spids vinkel til de longitudinelle grovfolder (I. fig. 2, fig. 3 og fig. 4. II: fig. 4c), eller parallelt med dem (II: fig. 1). De rombiske felter (EC) dækkede på tilfældig måde de underliggende grovfolder og mellemrummene mellem disse (I: fig. 2, fig. 3 og fig. 4. II: fig. 1 og fig. 4c). Cellernes overflade var i sølvfarvede præparater fint chagrinerede med tætliggende rundagtige elevationer (I: fig. 5. II: fig. 1b). I ikke sølvfarvede præparater fra 4 dyr (II: fig. 2) var cellegrænserne stedvis antydende som svagt konturerede, let bugtede folder i et antydende rombisk mønster, overfladen var stedvis fint foldet, og de rundagtige elevationer var mindre fremtrædende. I 29 aortae, som var registreret velpræpareret p.g.a. homogen glat overflade ved lille forstørrelse og få uregelmæssig-

heder ved stor forstørrelse, var antallet af EC $4.000-5.000/\text{mm}^2$, og EC målte ca. $10 \times 50 \mu\text{m}$. Membrana elastica interna var tydeligt fenestreret, hvor intima tilfældigt var skrabet af (II: fig. 3a). Ved præparatets snitrand viste membrana elastica interna tværskårne folder af samme dimensioner som ovennævnte grovfolder (II: fig. 3b).

I 13 aortae var overfladen ikke homogen og glat ved lille forstørrelse, og stor forstørrelse viste forandringer, som umiddelbart så ud som artefacts. Uregelmæssighederne varierede fra præparat til præparat, men tenderede til at være domineret af samme type i præparater fra samme forsøgsdyr. Grove ændringer som afløsning af endotelet tæt ved snitrande tolkedes let som mekanisk distorsion. Andre formodede artefacts kunne ikke refereres til nogen bestemt fase i præparationsproceduren: skrumpningsfænomener (II: fig. 4) og distorsion af vævet (II: fig. 5). I sin letteste form (II: fig. 4a) ytrede skrumpning sig ved elevation af cellens karnedel med accentuering af sølvlinjernes takkede konfiguration, mest fremtrædende mellem grovfolderne. I svære tilfælde fremstod som følge af oprulning af cellerne tenformede dannelser, som omsluttede cellekernen (II: fig. 4b), og sølvlinjerne manglede. Skrumpede oprullede celler med tilspidsede ender (fig. 4c og d) optrådte hyppigt som parallelt lejrede strukturer, der i spidse vinkler krydsede fra én elasticafold til den næste og lignede "intercellularbroer". Disse bro lignende dannelser var ca. $20 \mu\text{m}$ lange og $4 \mu\text{m}$ brede. I teknisk vellykkede præparater varierede antallet af bro lignende dannelser fra $0-800/\text{mm}^2$, mens antallet i teknisk mindre gode præparater varierede fra $3.200-14.000/\text{mm}^2$.

Distorsion af vævet (II, fig. 5) med skrumpning af intercellulære forbindelser og af subendotelialt væv optrådte i svært forandrede præparater i bunden af furerne mellem elasticafolderne som transverselt lejrede timeglaslignende "broer".

Oprulning af EC afdækkende subendotelialt væv var hyppig på

overflader af normalt udseende (II, fig. 6).

Overfladelysmikroskopi af sølvfarvede wholemount præparater viste samme mønster af sølvlinjer som SEM (I: fig. 1). Ved TEM var cellemembranerne intakte, men ultrastrukturen var dårligt fremstillet. Sølvudfældningerne var synlige som uskarpt afgrænsede amorfe hobe af betydelig bredde oven på cellekontakterne og som kileformede aggregater mellem cellerne. "Støvagtige" sølvudfældninger var synlige på cellernes overflade, i cytoplasmaet og under cellerne (jf. de Bruijn et al. 1974, fig. 6). Ved lysmikroskopi af halvtynde snit var sølvudfældningerne synlige som små mørke punkter lejret oven på formodede cellegrænser ud for cellernes tyndeste partier (jf. V, fig. 3).

Diskussion

Præparationsmetoder og artefacts

Risiko for artefacts er til stede, idet fejlkilder i præparationsprocedurens enkelte trin kun delvis er kendte. Fejltolkning af egne SEM-billeder kan dels skyldes ikke erkendte artefacts knyttet til indøvet metodik, dels også, at direkte sammenligning med andre forfatteres observationer kun delvis er mulig, idet konsekvensen af forskelle i forsøgsprocedure ikke kendes.

I nærværende studier (I, II) har forsøgsproceduren mangler (jf. p. 8), som kan være årsag til artefacts. De anvendte væskers pH og osmolaritet var på flere punkter ugunstig (jf. p. 11). Skylningsvæsken glukose og sølvnitratopløsningen var ikke isotone og buffede til fysiologisk pH. Skylningstiderne før fikseringen var korte, men de levende celler kunne vel tænkes at blive ugunstigt forandret før fikseringen af ufysiologisk pH, osmotisk shock og ætsningseffekt af sølvnitraten. Fikseringsvæskens sammensætning var gunstig (p. 11), men perfusionsteknikken var belastet med muligheden for mekanisk distorsion af EC, idet fikseringstrykket stiger samtidig med, at vævet bliver mere rigtigt (p. 12).

Dehydreringsmetoden baseret på stigende koncentration af acetone (p. 12) rummer denne metodes risiko for distorsion af vævet ved passagen af væske-luftfasen (p. 9), men giver ved præparation af aortavæv efter sølvfarvning ringe skrumpning (Bowyer 1977). Ved coating havde rådighed over sputtering teknik sandsynligt været gunstigere (Stachelberger et al. 1977).

Observationerne benævnt artefacts i beskrivelsen (p. 14) er formentlig induceret ved præparationen, men uvist på hvilket trin i proceduren. En betydelig skrumpning af vævet også i velfremstillede præparater fremgår af det større antal EC/mm² i nærværende studie (p. 14) sammenlignet med antallet angivet ved andre metoder (Fry 1968, Kunz et al. 1978).

Usikkerhed knytter sig til de longitudinelle grovfolder (elastica-folder). Som artefacts kunne folderne opstå ved mindre skrumpning i det fedt- og vandfattige elastiske væv, eller som følge af postmortel kontraktion eller inadækvat fiksering m.h.t. tryk og varighed af perfusionsfikseringen.

Observationerne sammenholdt med andre forfatteres dokumentationer

Væsentlige problemer vedrørende tolkning af SEM billedet af aorta centrerer omkring mønsteret af grovfolder, relieffet af grænseområderne mellem EC og af EC's overflade.

Grovfolder i intima og "brolignende" strukturer

Shimamoto og hans gruppe beskrev i 1969 den normale intima ved SEM og meddelte opdagelsen af intercellulærbroer i endotelet (Shimamoto et al. 1969a, Sunaga et al. 1969a). Samme forsker-team beskrev præatheromatøse og atheromatøse forandringer med SEM (Shimamoto et al. 1969b) samt virkningen af epinephrine på endotelet (Sunaga et al. 1969b, Shimamoto et al. 1971). Præparationsmetoderne i de citerede arbejder var forskellige fra vore, og sølvfarvning var ikke anvendt. Men SEM billedet viste stor lighed i deres og vores publikationer (I, II). Samme obser-

vationer kunne tolkes meget forskelligt. Shimamoto et al. (1969 a og b), Shimamoto (1969) og Sunaga et al. (1969a og b) beskriver "longitudinal arranged lineal folds", senere benævnt "endothelial folds", og opfatter disse som EC anordnet en efter en i række. Vi tolkede de identiske "coarse longitudinal folds" som foldninger i elastica interna. Shimamoto's "oblique intercellular bridges" (Shimamoto et al. 1969a, b), identiske med Sunaga's "intercellular long bridges" (Sunaga et al. 1969a og b), svarede i udseende til vort "image of bridges". Efter vor opfattelse (II) er disse dannelser artefacts opstået ved oprulning af EC omkring kernen og løsning af cellens frie ender. Cellernes "brolignende" lejring mellem grovfolder skyldes EC's normale lejring i spids vinkel til grovfoldernes længdeakse. Sunaga et al. (1969a) beskriver "vertical intercellular bridges", som vi med benævnelsen "timeglaslignende broer" opfatter som islet i frakturlinjer i endotel og underliggende væv opstået ved kontinuitetsbrud i stærkt skrumpet væv (II). Groniowski et al. (1971) og Chisolm et al. (1973) bekræftede Shimamoto's og hans gruppes opfattelse af endotelfolder og intercellularbroer som normalanatomiske træk ved EC. Chisolm et al. (1972) tolkede forandringer i intima induceret ved hyperproteinæmi og hyperkolesterolæmi som opståede under medvirken af beskadigede intercellularbroer. En definitiv bekræftelse på vor tolkning af grovfolder og visse "brolignende" dannelser blev mulig ved en teknik, som muliggjorde SEM og TEM anvendt på samme præparat (Sunaga et al. 1973). Forf. erkender grovfolderne som foldninger i elasticamembranen og "broerne" som "distorted endothelial cells".

Et flertal af forskere har opfattet de longitudinelle grovfolder som fremkaldt af forandringer i membrana elastica interna, og teknikken ved perfusionsfiksering, trykkets højde og varighed tillægges betydning for elimination af folderne. Clark & Glagov (1976) bemærker korrekt, at vi ikke henfører folderne til inadækvat distension under fikseringen. Forf. viser, at folderne forsvinder ved trykfiksering ved arterielt tryk i 15-60 min., men at de er til stede ved fiksering under tryk lavere end diastolisk tryk og ved immersionsfiksering. Samme afhængighed af perfusionstrykket viste grovfolderne forekomst i forsøg, hvor

resultaterne af langvarig fiksering ved højt og lavt tryk sammenlignes (Davies & Bowyer 1975, Swinehart et al. 1976). I andre forsøg er grovfolderne mindre fremtrædende ved hypertension og ved fiksering ved fysiologisk tryk (Still & Dennison 1974), og væsentligt mindre iøjnefaldende ved adækvat trykfiksering sammenlignet med immersionsfiksering, men elimineres ikke helt (Gertz et al. 1975). Bannister et al. (1975) studerer a. carotis-anastomoser med SEM, bekræfter vor observation af foldninger i membrana elastica interna, men mener, at den normale længdefoldning af intima skyldes finere foldninger i endotellaget uafhængigt af elasticafolderne. Forf. dokumenterer deres opfattelse med billedet af en artificielt løsnet endotelflage, hvis foldningsmønster er væsentligt finere end de øvrige elasticafolder (Bannister et al. 1975, fig. 3). Dokumentationen dækker næppe forf.s tese. Endotelflagen var artificielt løsnet fra et præparat, udspændt og pinnet til kork. Elastiske kræfter i endotelflagen, accentueret af skrumpning i forbindelse med præparationen vil sandsynligvis bibringe den isolerede endotelflage større volumenformindskelse end det fikserede karsegment. Observationerne i nærværende studie (I og II), hvorefter EC danner et flortyndt lag adhærent til elasticafolderne isprængt tilfældigt fordelte kerneprominenser gør det berettiget at fastholde, at grovfolderne i SEM-billedet af aorta alene fremkaldes af foldninger i det underliggende elastiske væv. Bannister et al.'s (1975) teori om endotelfoldernes rolle som ekspansil reserve i forbindelse med udvidelse ved pulstrykket kan være principielt korrekt. EC's marginale flaps i forbindelse med foldninger i membrana elastica interna kan tilsammen udøve den af forf. foreslåede buffermekanisme. Det er ved hidtidige undersøgelser sandsynliggjort (Fuchs 1972 og 1977), men ikke bevist, at grovfolderne er arbitrære. Hovedargumentet herfor er, at de lader sig eliminere i SEM præparater og ved lysmikroskopi og TEM (Wolinsky & Glagov 1967, Guski et al. 1971) ved langvarig trykfiksering ved artificielt tryk.

Cellegrænser med og uden sølvimprægnering

Grundmønsteret af sølvlinjemønsteret ved SEM er identisk med observationer ved overflade lysmikroskopi (Zahn 1884, Efskind 1941,

Sinapius 1952 og 1956, Poole et al. 1958, Florey et al. 1959, Gottlob & Zinner 1959a, b). SEM viste, at sølvlinjerne var tydeligt eleverede og sammensat af en kornet, porøs masse. Nodøse fortykkelser optrådte regelmæssigt, hvor sølvlinjernes siksak-forløb skiftede retning. Sølvlinjernes relation til EC's grænsezone stemte overens med TEM ved egne undersøgelser (I, se ovenfor p. 15) og med dokumentationer af Florey et al. (1959) og de Bruijn et al. (1974). TEM studier af sølvfarvet væv har vist relation mellem sølvlinjernes nodøse fortykkelser og underliggende "transverse lines" uden at forholdet entydigt kan forklares (Gottlob & Hoff 1967).

Sølvlinjernes udseende var vidtgående uafhængigt af forskelle i præparationsvæskernes sammensætning. Imprægnering med ikke buffet sølvnitrat (Davies & Bowyer 1975, de Bruijn et al. 1974) giver gode resultater ligesom imprægnering med buffet sølvnitrat (Davies et al. 1976, Reidy & Bowyer 1977a, b og c). Sølvproteinat (de Bruijn et al. 1974) fremkaldte mere distinkte sølvlinjer, færre diffuse udfældninger på celleoverfladen, mindre penetration mellem cellerne, men principielt samme mønster af sølvlinjer.

Fikseringsmediet syntes ikke at være afgørende for sølvlinjernes præservasjon. Buffet glutaraldehyd (II, de Bruijn et al. 1974) fikserede sølvimprægneret væv ligeså godt som buffet formalin (Davies & Bowyer 1975, Reidy & Bowyer 1977a, b, Davies et al. 1976). Heller ikke dehydreringsmetoderne syntes afgørende. Lufttørring med flygtige væsker (I, II, Davies & Bowyer 1975, Davies et al. 1976, Reidy & Bowyer 1977a), lufttørring uden lipideks-traktionsmidler (Davies et al. 1976, Goode et al. 1977, Reidy & Bowyer 1977a og Bowyer et al. 1977), frysetørring (de Bruijn et al. 1974) eller CPD af ikke fedtimbiberet væv (Reidy & Bowyer 1977a) påvirkede ikke væsentligt udseendet af sølvlinjerne (over-sigt: Bowyer 1977).

En hovedindikation for at sølvfarve arterier er at opnå en pålidelig kontrol på EC's integritet (Davies & Bowyer 1975, Reidy &

Bowyer 1977a). Metoden udnytttes kun fuldt ud, hvis grovfolderne i membrana elastica interna elimineres (Davies & Bowyer 1975, Reidy & Bowyer 1977a), idet integriteten af EC i furerne mellem grovfolderne vanskeligt lader sig vurdere. Ved trykfiksering kan grovfolderne elimineres, og mønsteret af aflange rombiske EC klart overskues (Davies & Bowyer 1975, Reidy & Bowyer 1977a). Cellernes dimensioner (50 x 15 μm) (Davies & Bowyer 1975) var lidt bredere end i vore forsøg (50 x 10 μm) (II, se også p. 14), hvor grovfolderne ikke var eliminerede. Elimination af disse ændrede dog ikke sølvlinjernes udseende eller EC's aflange rombiske form væsentligt.

Uden sølvfarvning fremstod endotelcellegrænserne lidet markante i egne forsøg (I, II) som svagt antydede folder. Andre forf. har med held demonstreret marginal folds i disse områder (Tokunaga et al. 1973, Edenaga 1974), også på humane aortae efter immersionsfiksering (Albert & Nayak 1976). Ifølge Clark & Glagov (1976) var en tydelig fremstilling af marginal folds afhængig af fiksering ved adækvat tryk, hvorefter disse dannede et mønster af "taglagte" ("shingled") EC, idet marginal folds overlappede naboceller i blodstrømmens retning. Samme forf. formodede, at de elevere rede sølvlinjer i nærværende studie (I) "probably result to some degree from the deposition of silver beneath elevated marginal overlaps". Citerede forf.s bedre fremstilling af cellernes marginale områder uden sølvfarvning kan skyldes, at de har anvendt CPD.

Celleoverfladen

I sølvfarvede præparater var EC's overflade "chagrineret" med rundagtige små elevationer, og andre forf.s SEM billeder af sølvfarvet endotel frembød samme udseende. Uden sølvfarvning (I, II), var overfladen stedvis fint foldet og frembød færre rundagtige elevationer end i sølvfarvede præparater. Andre forf. har i ikke sølvfarvede præparater påvist mikrovilluslignende dannelser på EC's overflade, men kun på bestemte lokaliteter: truncus pulmonalis (Smith et al. 1971), sinus trunci pulmonalis, arcus aortae, ductus Botalli-arret (Tokunaga et al. 1973, Edenaga 1974 og 1975, Fujimota et al. 1975), i endocardiet (Edenaga 1975) samt udbredt

i humane fostres kar (Fujimota et al. 1975) og i rottens ganglion Gasserii og testes' kar (Gabbiani & Majno 1969). Andre overfladestrukturer som cilier, craters og "pin holes" er også beskrevet (Edenaga 1974). Ifølge samme forf. var præservationen af mikrovilli afhængig af temperaturen i flushing medium, og Peine & Low (1975) hævder, at villøse protrusioner er artefacts fremkaldt ved brug af "holding solutions" af typen Ringers væske før fikseringen. Gertz et al. (1975) og Clark & Glagov (1976) udtrykker skepsis over for observation af mange overfladeprojektioner, som de mener kan forklares ved inadækvat præparation af vævet. Albert & Nayak (1976) påviser i human aorta studeret 30 minutter post mortem spredte mikrovilli, huller i overfladen tolket som mikropinocytosevesikler samt veludtalte marginal folds. Forf. anser disse mikrovilli for ikke permanente dannelser, der genspejler EC's reaktion på ændringer i deres naturlige miljø eller artificielt på de anvendte præparationsvæsker.

Metodernes anvendelighed og sammenlignelighed

Standardmetoden indøvet i vort laboratorium er ved sammenligning med up-to-date krav til metoden belastet med mangler. Fikseringsmediet er godt (p. 11), og den korte tid til skylning og sølvpræparation før fiksativets indførelse sikrer hurtig kontakt mellem celler og fiksativ. Men væskernes sammensætning var ikke optimal (p. 15) og heller ikke perfusionsproceduren; dels har den ikke elimineret grovfolderne, dels rummer den risiko for mekanisk distorsion af vævet (p. 17 og 15).

Den anvendte lufttørringsprocedure er muligvis mindre god ved fremstilling af finstrukturer som marginal folds, og CPD burde været anvendt på ikke sølvfarvede præparater. Sølvnitrat kunne være erstattet af sølvproteinat af hensyn til mere distinkt cellegrænsefarvning og mindre sølvudfældning på celleoverfladerne (p. 19).

Sølvfarvningsmetoden har imidlertid opfyldt kriterierne på en standardmetode, der giver reproducerbare resultater i eget regie fra forsøg til forsøg. Metoden har yderligere vist sig at være

uafhængig af variationer i præparationsproceduren (Bowyer 1977) i en sådan grad, at observationer i egne undersøgelser direkte kan sammenlignes med andre forfatteres dokumentationer.

Konklusion

Fremstilling af EC's sølvlinjemønster til SEM er en "robust" metode. Den er vidtgående uafhængig af præparationsvæskernes sammensætning og fremstilles lige godt ved lufttørring og CPD. Metoden giver et godt billede af EC-lagets integritet og overblik over cellemønsterets regelmæssighed, bedst hvis grovfolderne i membrana elastica interna elimineres ved adækvat trykfiksering.

Sølvlinjerne dækker EC's randzoner og dermed muligheder for at se forandringer i disse vigtige zoner. Sølvnitrat kan formodes at ætse finstrukturer på overfladen og gør yderligere vurdering vanskelig, fordi sølvet udfældes diffust på overfladen.

Uden sølvfarvning var differentiering af EC's grænsezoner og celleoverflade mindre god i egne forsøg, muligvis sammenhængende med persistens af grovfolderne og brug af lufttørring i stedet for CPD.

En "ideelt" fremstillet intima med SEM præsenterer sig sandsynligvis fuldstændig glat uden grovfolder med et regelmæssigt "taglagt" mønster af marginal folds og let eleverede aflange ovale kerneprofiler. Om udseendet af celleoverfladen ved "ideel" præservering kan p.t. intet sikkert gisnes.

Hidtidige metoders perfektion rækker endnu ikke til at dechifrere finstrukturen af den intime barrieres overfladeanatomi.

KAPITEL II

Scanning elektronmikroskopi (SEM) og overfladelysmikroskopi af aorta thoracica efter ballonlæsion og toksiske doser noradrenalin

Forsøgsmodellernes patofysiologiske relevans

Arterievæggens bindevæv er både under normale og patologiske forhold underkastet konditioner, som er enestående for mesenchymalt væv (Haust 1971). Intima og størstedelen af media mangler kapillærer (Wolinsky & Glagov 1967), og vævets ernæring beror væsentligt på tilførsel af næringsstoffer og metabolitter fra blodbanen. EC og bindevævs glykosaminoglykaner (GAG), elastin og kollagen spiller en rolle i en selektiv stoftransport, der foregår via betydelige tryk- og diffusionsgradienter fra blodbanen og ind i karvæggen. Normalt opretholdes en balance mellem influx af stoffer og disses clearing gennem kapillærer og lymfekar i adventitia. Ændringer i blodtryk, ændret sammensætning eller mængdeforhold af de stoffer, som trænger ind, mekanisk beskadigelse af endotel og/eller bindevæv kan forstyrre balancen. Inflammatoriske ændringer, permeabilitetsændringer, øget penetration og kumulation af plasmakomponenter er eksempler på selvforstærkende mekanismer, der kan ødelægge karvæggens homeostase.

Inflammatoriske, thrombotiske og reparative forandringer afspejles i et væv, der pga. pulstrykkets og hemodynamikkens påvirkninger aldrig er immobiliseret, og til forskel fra granulationsvæv andet sted er kapillærer ikke initialt til stede (Haust 1971). SMC og ikke fibroblasten er den bindevævsdannende celle i helende karvæv (Haust et al. 1960, Buck 1961 og 1963, Wissler 1968, Wolinsky 1973, Wight & Ross 1975).

EC og SMC spiller afgørende roller i arterievæggens homeostase. EC-beskadigelse med øget adgang til underliggende væv af plasmakomponenter påfører SMC et stimulus til proliferation (Ross & Glomset 1973 og 1974, Ross & Harker 1976). Reendotelialisering af en intimadefekt bringer i kraft af EC's barrierefunktion det

proliferative response af SMC til ophør (p. 56).

For atheromatosisens multifokale optræden synes hemodynamiske påvirkninger (Stehbens 1975), EC-beskadigelse og/eller øget permeabilitet at spille en rolle for læsionernes lokalisering. Predelektionsstederne for spontan arteriosclerose i arcus aortae, sinus Valsalvae, Botalli-arret og ved karforgreningers afgange er samtidige predelektionssteder for binding af kolloide farvestoffer in vitro (Okuneff 1926) og for Evans blue (McGill et al. 1957, Packham et al. 1967, Bell et al. 1972). Samme lokaliteter viser optræden af devitaliserede EC (Björkerud & Bondjers 1972, Reidy & Bowyer 1977a, Svendsen & Jørgensen 1978), forskelle i EC-mønsteret efter sølvfarvning (Caplan et al. 1974, Reidy & Bowyer 1977a), ændret ultrastruktur af EC og subendotelialt væv (Gerrity et al. 1977), øget optagelse af ^{131}J -albumin (Packham et al. 1967), ^{131}J -fibrinogen (Bell et al. 1974) og 3H-cholesterol (Somer & Schwartz 1971 og 1972). Predelektionsstederne for vitalfarvning med Evans blue viser tillige øget endotelial turnover (Caplan & Schwartz 1973, Wright et al. 1975), vulnerabilitet for endotoxininduceret skade (Reidy & Bowyer 1977b og c, Gerrity et al. 1976) og for hypercholesterolemi ledsaget af nyreinsufficiens (McGill et al. 1957) og for hypercholesterolemi (Okuneff 1926, Friedman & Byers 1963, Goode et al. 1977), samt ændret lipidmetabolisme (Somer et al. 1974).

Koincidensen af EC-beskadigelse, øget permeabilitet og reaktive forandringer i det subendoteliale bindevæv kan bero på direkte hemodynamisk påvirkning af EC (Flaherty et al. 1972a og b, Fry 1972), på EC-skade induceret af trombocytter via hemodynamiske mekanismer (Jørgensen et al. 1972) og på stimulation af SMC's proliferation via platelet releasing factors (Ross & Harker 1976, Moore et al. 1976, Friedman et al. 1977, Tiell et al. 1978).

Arterielæsioner, som ligner eller nærmest er identiske med spontan arteriosclerose kan fremkaldes ved eksperimentelt at overdimensionere effekten af kendte patogenetiske faktorer. Som eksempler kan nævnes hypercholesterolæmi (Anitschkow 1913 og 1933, 1967,

Duff 1935, Leary 1941, Kelly et al. 1952, Katz & Stamler 1953, Rowsell et al. 1960, Constantinides 1961 og 1965, Wissler et al. 1962, Parker & Odland 1966 og Ross & Harker 1976), katecholaminer (Josué 1903 og 1905, Braun 1907, Otto 1911, Lange 1924, Oester 1959, Friedman et al. 1955, Anitschkow 1933, Lorenzen 1963a og b, Yu & Blumenthal 1965, Cavallero et al. 1972), hypertension (McGill et al. 1961), hormoner (Friedland 1933, Balo 1939, Lorenzen 1963b, Katz & Pick 1967), toksiner og immunologiske reaktiver (Duff 1932, Gaynor 1972, Freudenberg & Häublein 1975, Gerrity et al. 1976), homocystinemi (Harker et al. 1976) og hypoxi (Helin & Lorenzen 1969, Helin et al. 1969, 1974 og 1975).

Stor lighed med spontan atherosclerose har læsioner fremkaldt af hypercholesterolemi i forbindelse med anden eksperimentel læsion, varmpåvirkning (Schlichter et al. 1949), frysning (Taylor et al. 1950, Kelly et al. 1952, Taylor 1954 og Cox et al. 1963), røntgenbestråling (Lee et al. 1971), thyroxin (Friedland 1933), adrenalin (Anitschkow 1933), adrenalin-thyroxin (Constantinides et al. 1958), hypertension (Bronte-Stewart & Heptinstall 1954, Heptinstall & Porter 1957, Heptinstall et al. 1958, Fisher et al. 1958), mekanisk læsion (Ssolowjev 1932, Friedman & Byers 1965, Ross & Harker 1976) eller ved operativt inducerede ændringer i hemodynamikken efter anlæggelse af arteriovenøse anastomoser og eksperimentelle aneurismer (Fallon & Stehbens 1972, Stehbens 1973).

I forsøgsmodeller baseret på mekanisk beskadigelse er anvendt meget forskellige fysiske og kemiske påvirkninger. Som eksempler kan nævnes abrasion af intima med ujævn kobbertråd (Poole et al. 1958), abrasion med korkborer og gaze (Cotton et al. 1961), cirkumskripte incisioner (Prior & Hutter 1955, Björkerud 1969, Björkerud & Bondjers 1971a og b), vibrationstraume med kviksølvfyldt kateter (Hirsch & Robertson 1977), temporær ligatur eller afklemning (Zahn 1884, Gottlob & Zinner 1962, Glagov & Tsao 1975), suturimplantation eller ligatur (Efskind 1941, Buck 1961, Poole

et al. 1971, Webster et al. 1974a og b, Glagov & Tsao 1975), varmepåvirkning (Ssolowlew 1929), frysning (Taylor et al. 1950, Taylor 1954), kaustisk påvirkning (Hill 1910, Lange 1924, Veress et al. 1969, Kadar et al. 1969), elektrisk påvirkning (Lange 1924), røntgenbestråling (Efskind 1940-41, Kirckpatrick 1967), ultrasonisk påvirkning (Fallon et al. 1972) og læsion med embolomikteter (Baumgartner & Studer 1963, Studer & Lorez 1967, Haudenschild & Studer 1971, Helin et al. 1971a og b, Stemerman & Ross 1972, "III", Ross & Glomset 1974, Schwartz et al. 1975, Spaet et al. 1975, Ross & Harker 1976, Stemerman et al. 1977, Tiell et al. 1978) og luftinsufflation (Fishman et al. 1975, Clowes & Karnovsky 1977a og b, Clowes et al. 1978).

Fælles træk for mekaniske læsioner er vævsbeskadigelse efterfulgt af inflammatoriske og reparative forandringer. De reparative processer efter ballonlæsionen (Helin et al. 1971 a, b) viser stor lighed med forandringerne i granulationsvæv andre steder i organismen og er tolket som uspecifikke helingsprocesser (jvf. p.4).

Den neointimale hyperplasi fremkaldt ved SMC's proliferation og syntese af bindevæv viser stor lighed med den fibromyoelastiske hyperplasi, hvis betydning som adaptivt fænomen til vækst og normal funktion (Vlodaver & Neufeld 1967) og/eller patologiske betydning for atherosclerose diskuteres (McGill 1977). Den optræder som spontanforandring i coronarkar og aorta hos mennesket fra første leveår (Gross et al. 1934, Prior & Jones 1952, Movat et al. 1958, Levene 1956a og b, Schornagel 1956, Moon 1957, Velican & Velican 1976, Rapola & Pesonen 1977) og ses også hos dyr kombineret med lipidophobning (French et al. 1963 og 1965). Den hyperplastiske intimale reaktion efter mekanisk læsion genspejler ifølge Haust (1971) og Glagov & Ts'ao (1975) en remodeling af den oprindelige media. Reaktionen kan tolkes som re-etablering af normal vægtykkelse på det beskadigede sted. Skadevirkningen ved den tangentielle spænding i forbindelse med blodtrykspåvirkningen ville hermed nedsættes (Laplace's formel $T = \frac{R \times P}{H}$ T: tangential spænding, R: radius, P: tryk, H: vægtykkelse) (cit. Björkerud 1969).

Den patogenetiske relevans af ballonlæsionen er m.h.t. atherogenesens initiale faktorer dubiøs. Deendotelialisering og læsion af bindevæv er relevante faktorer i atherogenesen, men omfanget af deendotelialisering og graden af bindevævsbeskadigelse overstiger ved ballonlæsion excessivt, hvad der kan forekomme i den intakte organisme. De reparative processer i bindevævet lignede imidlertid bindevævsforandringerne ved arteriosclerose (Helin et al. 1971 a, b). Den samtidige regeneration af EC og deltagelse af SMC i proliferation og bindevævsdannelse er parallelt løbende processer, som ifølge Ross & Glomset (1973 og 1974) og Ross & Harker (1976) spiller hovedroller i atherogenesens patogenese. Forsøgsmodellen giver gode muligheder for studie af helingsprocesser i endotel og bindevæv, idet læsionen er ekstensiv, velegnet til overfladestudier (III, VI), vævsmaterialet er rigeligt, og studiet af de parallelle helingsforløb i EC og SMC kan strækkes over lang tid (III, VI, VII-VIII).

Noradrenalinlæsionen (injektion af toksiske doser noradrenalin) kunne forventes at være patofysiologisk relevant m.h.t. atherogenesens initiale faktorer, idet noradrenalin er et stress hormon og udløser hypertension. Virkningen på aortavæggen ligner imidlertid mere Mönckebergs mediasclerose (Mönckeberg 1903). Særlig interesse knytter sig til intima's overfladeanatomi ved sammenligning mellem ballonlæsion og noradrenalinlæsion. Begge læsioner udløser næsten identiske bindevævsreaktioner (Garbarsch 1976, Helin 1977) uden samtidig mekanisk deendotelialisering i forbindelse med noradrenalinlæsionen.

Ballonlæsion af aorta thoracica (III)

Materiale og metoder

Materialet omfattede 101 hanlige kaniner af dansk landrace, 5 måneder gamle og omkring 3 kg legemsvægt.

Ballonlæsionen udføres i generel anæstesi Nembutal/propanidid med et Fogarthy embolectomikateter (12-080-5F) indført via a. femoralis sin. med ikke opblæst ballon til arcus aortae. Ballonen fyldes med 3 ml luft, og kateteret retraheres med et rask, jævnt træk, indtil modstand føles ved diafragma. Herefter exsuffleres ballonen, kateteret retraheres og a. femoralis sin. ligeres. Ved skinoperation foretages simpel ligatur af a. femoralis sin.

Autopsi blev udført 3-6-14-30-60-180 dage efter operationen med og uden perfusionssølvfarvning (III, Tabel 1) med standardiseret teknik (I og II, p. 11).

SEM udføres på 52 kaniner, 31 med ballonlæsion og 21 med skinoperation, ligatur af a. femoralis sin., i alt 33 blev sølvfarvede, 19 blev studeret uden sølvfarvning. Fra hvert dyr blev 4 aortacylindre fra aorta thoracica (8 SEM-præparater) anvendt til SEM, og 1 cylinder (2 wholemount præparater) anvendt til overfladelysmikroskopi. Disse postfikseres i neutral buffet 4% formaldehyd, 4° C, klares i glycerin, adventitia fjernes, og præparaterne monteres på objektglas med Apathys sirup (Pearse 1968).

Overfladelysmikroskopi og bindevævshistokemiske undersøgelser udføres på 49 kaniner, 30 med ballonlæsion og 19 skinopererede; alle blev sølvfarvede. Fra hvert dyr blev to aortacylindre fra midten af aorta thoracica undersøgt ved overfladelysmikroskopi, og tre ringbiopsier fra øverste, mellemste og nederste afsnit af aorta thoracica blev farvet med forskellige bindevævsfarvnin-ger til sammenligning med tidligere observationer (Helin et al. 1971a og b).

Endotelets healing efter ballonlæsion belyst ved SEM og overfladelysmikroskopi

Observationer

I kontrolmaterialet af skinopererede dyr var alle præparater makroskopisk normale og frembød ved SEM (III, fig. 1) og overfladelysmikroskopi (III, fig. 2a) samme udseende som sølvfarvede og

ikke sølvfarvede præparater i tidligere forsøg (I, II).

I forsøgsmaterialet frembød aortae efter 14 dage samme makroskopiske forandringer som beskrevet af Helin et al. (1971a): dilatation, confluent hvidlige plaques, bønneformede ekskavationer, longitudinelle slyngede elevationer lateralt for ica og spredte forkalkninger. Transmissionslysmikroskopi bekræftede tidl. observationer, Helin et al. (1971a): distorsion af elastiske membraner, øget interlamellær substans, inflammatoriske reaktioner, nekroser, forkalkninger og en betydelig neointimal hyperplasi. Biokemiske og histokemiske forandringer fremgår af C. Garbarsch (1973a og b og 1976) og P. Helin (1977).

Overfladelysmikroskopi og SEM gav vidtgående overensstemmende oplysninger, hvorfor detaljeret beskrivelse kan baseres på observationerne ved SEM.

Lysmikroskopisk oversigt

Lysmikroskopi viste efter 3 dage ekstensive områder med blotlagte fenestrerede elastiske membraner (jf. VI, fig. 4b), spredte palisademønstre af tenformede celler, formentlig SMC (jf. VI, fig. 4c) og stærkt lysbrydende rundagtige legemer, formentlig thrombocytter og blodceller. Normalt endotel var synligt omkring ica og i ikke læderet område cephalalt og caudalt for læsionen. Ved randene af disse områder var flade protoplasmarike, stedvis isolerede celler iøjnefaldende. Efter 6 dage var betydelige områder dækket af hexagonalt endotel isprængt kæmpeceller og af "foam-like patterns" (III, fig. 2 b, c, jf. III, fig. 5 og fig. 6), og disse sølvlinjemønstre persisterede til 180 døgn efter læsionen. Mange steder optrådte mønstrene i hvirvelformede strøg, og cellernes længdeakse var transversel til karrets længdeakse. Ekstensive felter var endnu 60 og 180 døgn efter læsionen ikke dækket af sølvlinjemønstre, men af et amorft brunligt materiale.

I løbet af 6 døgn repræsenterede sølvfarvede præparater alle forandringer, som var til stede til forsøgets slutning. Den følgende redegørelse er baseret på SEM.

Denuderet flade frembød de første 3 dage et broget billede af blotlagte fenestrerede membraner (jf. II, fig. 3a, VI, fig. 4b), uidentificerbare masser af cellefragmenter, samt amorf og trådet substans, uvist om det drejede sig om subendotelialt bindevæv eller fibrin. Stedvis persisterede isolerede øer af EC. Efter 6 dage dannede amorf og trådet substans, dækket af et monolag af thrombocytter, leukocytter (III, fig. 8 og fig. 10) samt større celler med udløbere, muligvis monocytter (III, fig. 11) et stærkt vekslende mønster. Egentlige thromber blev ikke observeret.

Hexagonale mønstre (III, fig. 4 og fig. 7 t.v., conf. VI, fig. 5c, fig. 7b) var til stede fra 3. døgn og optrådte i kontinuitet med normalt udseende endotel omkring ica og ved læsionens rande, og typisk udklædte det bunden af bønneformede excavationer. Mønsteret bestod i ensartet store og afrundede ("hexagonale") felter afgrænset af grove ensartet tykke ligeforløbende sølvlinjer, og ved kernefarvning af Häutchen i senere forsøg (VI) kunne inden for disse konturerne af runde eller ovale kerner anes (jf. VI, fig. 7b og sml. IV, fig. 3c).

"Foam-like patterns" var til stede fra 6. dag (III, fig. 2b t.v., fig. 5, fig. 6, fig. 7, jf. VI, fig. 6 a,b). Mønsteret dækkede typisk store tilsyneladende fortykkede områder, og der var aldrig kontinuitet mellem dette mønster og mønstrene af normalt eller hexagonalt endotel. "Foamlike patterns" var mere pleomorfe end hexagonale mønstre, men kunne identificeres på fælles træk, som adskilte dem fra alle andre mønstre. Sølvlinjerne afgrænsede masker af forskellig størrelse og var tynde med bugtet forløb isprængt små "øjer" (III, fig. 5b, conf. VI, fig. 6b). Inden for rammerne af større masker var konturerne af en eller to let eleverede kerneprofiler ofte synlige (III, fig. 5b), og det var derfor plausibelt, at større masker repræsenterede celler. De mindre "øjer" (III, fig. 5b, jf. VI, fig. 6b) var til gengæld for små til at repræsentere selvstændige celler.

Polariserede cellemønstre optrådte dels i områder af ikke lade-ret endotel, hvor cellernes længdeakse var parallel med karrets (III, fig. 2 a,b, jf. I, fig. 1, fig. 2, jf. II, fig. 1 a,b), dels i områder af nydannet intima (III, fig. 6, jf. VI, fig. 5d). Polariserede cellemønstre var fremtrædende, hvor intima's flade fremviste niveauforskelle p.g.a. udbulninger adskilte af lister og kamme. Her optrådte polariserede cellemønstre ofte i hvirvel-lignende formationer, ofte med cellernes længdeakse vinkelret på karrets (III, fig. 6). Polariserede mønstre af nydannet endotel lignede meget normalt endotel bortset fra, at sølvlinjerne var tykkere med mindre fremtrædende nodøse fortykkelser og viste gradvis overgang i hexagonalt endotel og i endotel omkring ica.

Grænsezonerne mellem endotel og "foam-like patterns" var altid knivskarpe og i regelen i samme niveau (III, fig. 6, jf. VI, fig. 4 d og fig. 6c). Men hvor niveauforskelle ved SEM optrådte, var altid mønsteret af "foam-like patterns" tykke, og grænse-linjen syntes at overskære kontinuiteten i sølvlinjemønsteret svarende til endotelet (III, fig. 7).

Grænsezoner mellem endotel og denuderet flade var i forsøgets første døgn skarpe med profiler af afskårne celler (jf. VI, fig. 4a, sml. "2", fig. 3). Efter 6. døgn var grænsezonerne markante, men ujævne, isprængt kæmpeceller, og i selve randzonen var protoplasmarike celler fremtrædende, som strakte udløbere ud over denuderet flade, delvis adskilte fra naboceller (III, fig. 2 d, og fig. 8). Fritliggende EC sås stedvis på denuderet flade tæt ved randen af endoteldækket område (sml. "2", fig. 2 og 4).

Endoteliale kæmpeceller optrådte fra 3. dag i randzonerne af endoteldækket område, og var her hyppigt til stede i alle senere forsøgsfaser (III, fig. 2 c,d, fig. 8, jf. VI, fig. 7a). I områder af helende endotel fjernere fra randen var kæmpeceller fremtrædende i forsøgets første uger (jf. VI, fig. 5 a,b) aftog i hyppighed i forsøgets senere faser, men persisterede sporadisk efter et halvt år.

På ét punkt nemlig i forsøgsperioderne 30 og delvis 60 døgn efter læsionen var der diskrepans mellem observationerne ved SEM og overfladelysmikroskopi. Mens lysmikroskopi intet afvigende viste m.h.t. sølvlinjemønstre og grænsezoner, svigtede sølvfarvningen til SEM, og der optrådte påfaldende mange frie celler på overfladen. Cellemønstrene var i stedet aftegnet af stærkt interdigiterende stærkt forgrenede marginal folds (III, fig. 9 og 12), og de frie celler var dels runde celler, formentlig leukocytter (III, fig. 10), dels store celler med forgrenede pseudopodier, formentlig monocytter (III, fig. 11). Leukocytterne viste tendens til at være ophobet lineært på celledækket område tæt ved grænsezoner, mens de mononucleære celler viste gradvis overgang til afladede celler, der var integreret i overfladen. Ved lysmikroskopi kunne lignende overgange konstateres mellem protoplasmarike celler og "foam-like patterns". Reduplikation af 30 dages forsøget bekræftede ovenstående observationer.

Efter 180 døgn dominerede sølvlinjemønstre, selv om denuderede flader af samme udseende som i tidligere forsøgsfaser dækkede betydelige flader. Sølvlinjemønstrene bestod i polariseret endotel isprængt kæmpeceller i jævn overgang til hexagonalt endotel, skarpt adskilt fra "foam-like patterns". I kontinuitet med hexagonalt endotel optrådte stedvis bizare "jig-saw-like" mønstre.

Diskussion

Observationer med SEM viste vidtgående overensstemmelser med lysmikroskopi af sølvfarvet intima efter cirkumskripte traumer (Zahn 1884, Efskind 1941, Gottlob & Zinner 1962, Hirsch & Robertson 1977), ekstensive mekaniske læsioner (Poole et al. 1958 og 1959, Cotton et al. 1961, Björkerud & Bondjers 1971a og b), indheling af kunststofproteser og endarterectomi (Florey et al. 1961, 1962, Poole et al. 1962, Poole 1964, Mackenzie & Loewenthal 1960-61) og af intima efter anlæggelse af A-V shunt eller dannelsen af artificielle aneurismer (Fallon & Stehbens 1972, 1973). I stedet for det normale sølvlinjemønster med aftegning af ensartet pola-

riserede aflange rombiske EC optrådte som fælles træk uregelmæssige sølvlinjemønstre, stedvis bizare cellemønstre og endoteliale kæmpeceller. Thrombotiske forandringer var beskedne. Problemer vedrørende tolkningen af de reparative processer angik identifikation af celletyper, betydningen af kæmpeceller, endotelets oprindelse og forskellig regenerationshastighed.

SEM af aorta efter ballonlæsion viste subtotal intimalæsion, moderate thrombotiske forandringer, "reendothelialisering" med to forskellige celletyper og langsom heling, som ikke var tilendebragt efter 180 døgn. Læsionen omfattede området fra arcus aortae til diaphragma, men øer af endotel var stedvis bevarede. Traumets dybde var uensartet og varierede fra blotlagt membrana elastica interna til rifter i EC laget og subendoteliale bindevæv. Ingen regulære thromber blev observeret ved studiet af ca. 800 aortahalvcylindre. Thrombocytter og leukocytter havde ingen affinitet til endotelceller og "foamlike patterns", men adhæerede til ikke identificerede amorfe og trådede elementer. Udgangspunkterne for regeneration af endotel var intakt endotel i grænseområder til læsionen og endotel i 9 par ica mundinger foruden tilfældigt overlevende øer af ikke fjernet endotel.

Hexagonale mønstre repræsenterede med største sandsynlighed genuint endotel. Endotelceller af denne form benævnes af andre forfattere "polygonale celler", "afrundede celler", "celler med tab af polarisering" eller med "lack of orientation". I humant materiale observerede Cotton & Wartman (1961) celler med "loss of polarity" som islet i EC-forandringer, der var tiltagende med alderen. Hos dyr ses tilsvarende polygonale celler som aldersrelateret forandring (Sinapius 1952, 1956). Caplan et al. (1974) observerer celler "rounder, shorter and less polar" i områder af arcus aortae, som farves med Evans blue proteinkomplex (p. 58). Ved eksperimentelle læsioner er hexagonale celler fremtrædende under helingen af cirkumskripte læsioner (Zahn 1884, Gottlob & Zinner 1962) og i cellemønstre iblandet endoteliale kæmpeceller efter

ekstensiv traumer (Poole et al. 1958, 1959, Cotton et al. 1961, Björkerud & Bondjers 1971a). Ved reendotelialisering af Dacron grafts (Florey et al. 1961, 1962) dominerer hexagonalt mønster, og i nærheden af suturstederne ved karkirurgiske indgreb er de fremtrædende (Fallon & Stehbens 1972). Ved hyperlipidemi er hexagonale EC fremtrædende (Ross & Harker 1976, Goode et al. 1977). Pugatch (1964) identificerer i ørekammerforsøg celler af hexagonal form som genuine EC til forskel fra flade celler af anden genese, pseudoendotel. Terminologien pseudoendotel er indført af Pugatch (1964) og i nærværende studier anvendt i overensstemmelse med hans definitioner.

Hexagonalt endotel og normalt udseende endotel viste gradvise overgange omkring ica, hvorfra sammenhængende endotelflager voksede ud (III, VI). Mønsteret var fremtrædende i bunden af bønneformede ekskavationer (p. 29), i plane områder af stærkt dilaterede kar samt i nærheden af grænsezoner. Hexagonalt endotel repræsenterer sandsynligvis EC's adaptation til dilatation af karvæggen og/eller er udtryk for proliferativ aktivitet i endotelet.

Efskind (1941) dokumenterer, at arterielt endotel antager hexagonal form, typisk for intakt veneendotel, når karret fikseres 24 timer efter udtagning, hvor afslappelse af tonus har fundet sted (jf. Efskind 1941, Abb. II og III). I overensstemmelse med disse observationer, hvorefter EC's polarisering ændres ved ændring af karvæggens tonus, er det plausibelt, at både lokal og generel dilatation af karvæggen kan have samme konsekvenser for EC's form.

Hexagonalt endotel kan sandsynligvis også repræsentere nydannet og prolifererende endotel. I Pugatch's ørekammerforsøg (Pugatch 1964) var EC mønsteret af ekspanderende endotel typisk hexagonalt, og Poole et al. (1958) påviste i randzoner af ekspanderende endotel efter mekanisk læsion celleformer af samme type med dobbeltkerner, tydelige nucleoler, uens kernestørrelse og kraftigere kernefarvning og indtil 5. døgn mitosefigurer. I et senere studie bekræftes disse observationer på kernefarvede Häutchenpræparater (VI, p. 67).

"Foam-like patterns" var opbygget af anden type celler end EC. Overgange mellem "foam-like patterns" og endotel blev aldrig observeret. EC og "foam-like patterns" var adskilte af skarpe grænser.

Analoge sølvlinjemønstre er præsenteret som "bizarre patterns" (Poole et al. 1958, 1959) og som uforklarligt fund på arterie-siden af artificielt aneurisme (Fallon & Stehbens 1973). Mønsteret af typen "foam-like" manglede helt i helingsmønsteret af pseudointima i Dacron grafts (Florey et al. 1961, 1962) og i normale kar (Sinapius 1952, Florey et al. 1959). "Foam-like patterns" er identiske med sølvlinjemønsteret af pseudoendotel i Pugatch's ørekammerforsøg (Pugatch 1964). Ifølge forf. var EC og pseudoendotel forskellige celletyper m.h.t. genese, ultrastruktur, fagocytoseevne og affinitet til kolloide farvestoffer. I ørekammerforsøget (Pugatch 1964) var pseudoendotel affladede mesenchymale celler, nogle af disse typiske makrofager. I andre forsøgsmodeller baseret på mekaniske arterielæsioner er pseudoendotelet modificerede SMC (Stemerman & Ross 1972, Schwartz et al. 1975, Spaet et al. 1975, Stemerman et al. 1977, Clowes & Karnovsky 1977a og b, Clowes et al. 1978, "1", VI, VII-VIII). Pseudoendotelets bizare udseende i aorta (III, VI) kan skyldes, at sølvet udfældes imellem pseudoendotelcellers viltert forgrenede og interdigiterende randpartier, hvori også indgår udløbere fra underliggende SMC ("1", VII-VIII, jf. p. 74).

Polariserede cellemønstre omfattede både endotel og pseudoendotel og optrådte i områder, hvor betingelser for påvirket flow, bedømt efter overfladens relief, var sandsynligt. Mønstrene var fremtrædende omkring lister og kamme mellem ekskavationer i væggen (p. 31) og lignede de hvirvelagtige mønstre, som udklæder A-V fistler og artificielle aneurismer (Fallon & Stehbens 1972 og 1973). I overensstemmelse med Flaherty et al. (1972b) kan hemodynamiske faktorer udøve stor indflydelse på EC's lejring og polarisering. Muligheder for hemodynamisk stress var udbredt til stede i forbindelse med karvæggens makroskopiske forandringer.

De skarpe grænsezoner mellem endotel og pseudoendotel blev opfattet som mødestedet mellem celleflager dannet af celler med forskellig genese (Pugatch 1964, p. 35). Iagttagelsen genkendes i Poole et al.'s beskrivelse (Poole et al. 1958, fig. 16), selv om forf. ikke skelner mellem to forskellige celletyper. Formodninger i SEM studiet (III), at en "linear basal lamina" var til stede i grænsezonen, blev afkræftet i senere forsøg (VII-VIII). SEM billedet af niveauforskelle mellem tykt pseudoendotel overlejrende sølvlinjer i EC mønsteret (p. 31) kunne ikke bekræftes i senere forsøg (VII-VIII) og beror sandsynligvis på artefacts som volumenændring under præparationen. TEM viste i senere forsøg, at EC overvokser pseudoendotel uden interposition af bindevæv (p. 73). Grænsezoner mellem endotel og denuderet flade var præget af hexagonalt endotel (III, VI, Poole et al. 1958: "lack of orientation") og kæmpeceller, mens cellerne i selve randen var protoplasmarike, delvis adskilte eller fritliggende (III, VI, Poole et al. 1958: "detached giant cells").

Kæmpeceller med multiple kerner ses efter heling af mekanisk læsion (Efskind 1941, Poole et al. 1958, 1959, Cotton et al. 1961), ved heling af suturlinjer (Fallon & Stehbens 1972), og de persisterer inkorporerede i mønsteret af nydannet endotel 499 døgn efter læsionen (Poole et al. 1959), og et halvt år efter læsionen (III, VI). Kæmpeceller ses som spontanforandring i arterier hos mennesket (Sinapius 1952, Lautsch et al. 1953, Cotton & Wartman 1961), og i atheromatøse kar efter røntgenbestråling (Efskind 1940-41). Pugatch (1964) observerede kæmpeceller i randen af ekspanderende endotelflader og kunne klart skelne dem fra kæmpeceller af makrofagtype. Endoteliale kæmpeceller indeholdt hyppigt mitosefigurer (Pugatch 1964) og genspejler måske et basalt reaktionsmønster, som kommer til udtryk ved vækst af nydannede kapillærer. Poole et al. (1958) nævner muligheden, at kæmpeceller i den helen-de aorta tilsvarende repræsenterer et syncytium, men at opdelingen af dette i enkeltceller har svigtet.

I randzoner af ekspanderende endotel optrådte delvis adskilte protoplasmarike celler samt "detached giant cells" (Poole et al.

1958). TEM har i in vivo forsøg (VII-VIII, p. 69) og i in vitro forsøg ("2") overensstemmende vist, at randstillede EC er uden differentierede cell contacts og frembyder ruffles, makropino-cytosevesikler og hobede mikrofilamenter (p. 73). Den ultrastrukturelle udrustning indicerer, at disse celler er i stand til at vandre (VII-VIII, p. 80). Ifølge Hirsch & Robertson (1977) og Sholley et al. (1977) indgår migration og proliferation som separate mekanismer i endotelfladers ekspansion både in vivo og in vitro. En forskel mellem in vivo forsøg (III, VI) og in vitro forsøg ("2") var en bred proliferativ zone af hexagonalt endotel isprængt kæmpeceller i in vivo forsøg (VI, Poole et al. 1958), mens in vitro ("2") alle celler på nær de randstillede var polariserede overvejende efter karrets længdeakse. Iagttagelsen støtter tesen om, at nydannet prolifererende endotel kan præsentere sig som hexagonalt endotel, men indicerer samtidig, at andre faktorer end hemodynamiske er bestemmende for EC's polarisering ("2").

Diskrepanserne mellem observationer ved SEM og lysmikroskopi 30 og 60 dage efter læsionen kunne ikke forklares. Metodefejl var næppe forklaringen, idet reduplikation af forsøget gav samme resultat. Den svigtende sølvfarvning i cellernes grænsezoner har en vis parallel i tidlige forandringer ved hypercholesterolæmi (Goode et al. 1977). Men sølvfarvemetodens lunefuldhed og manglende specificitet m.h.t. cellernes vitalitet (Sinapius 1956) gør tolkning umulig.

Betydningen af frie mesenchymale celler og talrige leukocytter er ukendt. Tilsyneladende overgange mellem frie celler og celler inkorporeret i overfladen kunne på SEM billedet tolkes som integration af mesenchymale celler i overfladen (p. 32). Cellerne kunne dog ligeså vel være i passage gennem overfladen som typisk for monocytter i første forsøgsdøgn (p. 70) eller som tilfældet er ved hypercholesterolæmi (Poole & Florey 1958), inflammation (Florey & Grant 1961) eller ved hypertension (Still 1968, Still & Dennison 1974).

Endotelets oprindelse og hastigheden for reendotelialisering
 Korrelerede undersøgelser med SEM og lysmikroskopi indicerede, at nyt endotel dannes fra i forvejen eksisterende endotel. Indiciernes beror på flademæssig kontinuitet mellem bevaret endotel omkring ica mundinger og EC ved læsionens ydergrænser, på jævne overgange mellem hexagonalt og polariseret endotel og på knivskarpe grænsezoner mellem flader dækket af endotel og pseudoendotel. Endotelets dannelse fra i forvejen eksisterende endotel er fremhævet af Poole et al. (1958), Florey et al. (1961,1962), Pugatch (1964), Fishman et al. (1975), Stemerman et al. (1977), Webster et al. (1974 a og b) samt i senere forsøg (VI, VII-VIII).

Hastigheden af reendotelialisering var hurtig i forsøgets første uger, siden langsommere og ikke komplet efter et halvt år (Poole et al. 1958 og 1959, Björkerud 1975, VI, VII-VIII). Endotel ekspanderer på bekostning af pseudoendotel og denuderede flader (Pugatch 1964, VI, VII-VIII). Regenerationshastigheden syntes at være hurtig for mekanisk læsion hos hund (Cotton et al. 1961) og for heling af Dacron grafts hos aber og hunde (Florey et al. 1961 og 1962, Poole et al. 1962), men meget langsommere hos kanin (Poole et al. 1958 og 1959, III, VI, VII-VIII). Björkerud (1969) og Björkerud & Bondjers (1971b) viser, at regenerationshastigheden afhænger af traumets art hos samme dyr. Faktorer, som fremmer helingshastigheden synes at være bred grænsezone til ikke læderet felt (Cotton et al. 1961), mange vaskulære kanaler (Florey et al. 1961 og 1962) og arterielle sidegrene (Poole et al. 1962). I ballonforsøget var disse betingelser til stede: intakt endotel i arcus aortae og aorta abdominalis, samt i 9 par ica mundinger. Den meget langsommere heling i dette forsøg (III, VI, VII-VIII) taler for, at kaninens reparative potentiel er overbelastet i lighed med "non-regressive lesion" (Björkerud & Bondjers 1971b).

Konklusion

SEM metoden forenede stor opløsningsevne og tredimensionale

billeder med let adgang til overblik af store flader. Metoden kombineret med sølvfarvning var fortrinlig til bedømmelse af fladernes integritet. Cellemønstrenes morfologi kunne korreleres til niveauforskelle, og frie cellers affinitet til forskellige cellemønstre og/eller trådet substans. I begge henseender var SEM lysmikroskopi klart overlegen. Metoden havde ulemper. Artefacts og en overvældende mængde detailobservationer var en permanent trussel imod et nøgternt overblik og en afvejet evaluering af detailændringer. Mitoser kunne ikke fastslås ved SEM, hertil var kernefarvet Häutchen præparater egnet (VI). Arten af trådet og amorf substans kunne ikke bestemmes ved SEM. Metoden gav yderligere et misvisende billede af visse niveauforskelle, som først blev erkendt som artefacts ved TEM i senere forsøg (p. 36). Overblik over cellemønstres opbygning og kontinuitet var lettere ved lysmikroskopi, men lige pålidelig ved begge metoder.

SEM's fortrin ved studiet af helende intima beror på adgangen til at korrelere cellemønstre med variationer i overfladens relief og i at påvise interrelation mellem frie celler og bindevævselementer. En udnyttelse af metodens store opløsningsevne til studiet af cellers randzoner og plasmamembraner vil fordre en forbedret præparationsteknik uden sølvfarvning (jf. p. 22).

Korrelerede undersøgelser med SEM og lysmikroskopi genbekræftede andre forf.s observationer baseret på lysmikroskopi m.h.t. celleoverfladernes morfologi. Observationer i nærværende studie (III) tillod følgende konklusioner:

- Reendotelialisering af kaninens aorta thoracica er først hurtig, siden langsom og ikke afsluttet efter $\frac{1}{2}$ år.
- Reendotelialisering med genuint endotel finder sted fra i forvejen eksisterende endotel.
- Reendotelialisering med pseudoendotel skyldes celler af anden genese end endotel.

- Thrombotiske islæt var meget beskedne og knyttet til denuderet flade, men ikke til hverken endotel eller pseudoendotel.

Koncept af helingen af intima efter ballonlæsion baseret på nærværende studier (III, VI, "2", VII-VIII)

Den denuderede flade dækket af et inhomogent monolag af thrombocytter, cellerester, amorf og trådet substans vil på forskellige tidspunkter efter læsionen blive overvokset af endotel, erstattet af pseudoendotel eller forblive uændret forsøgsperioden ud (III, VI).

Endotel ekspanderer som sammenhængende flager i kontinuitet med i forvejen eksisterende endotel ved læsionens grænser og fra mundingerne af ica (III, VI). Nydannet endotel er hexagonalt isprængt kæmpeceller. Ekspansionen over denuderet flade sker ved proliferation tæt ved endotelflagens rande og ved vandring i selve randzonen af protoplasmariige EC ud over denuderet flade. Ekspansion af EC hen over flader dækket af pseudoendotel sker ved overvækst af pseudoendotelet uden interposition af bindevæv (VII-VIII) og en face præsenterer grænsezoner sig knivskarpe (III, VI). EC i grænsezonerne mangler differentierede cellekontakter og er udrustet med ruffles, makropinocytosevesikler og mikrofilamenter, tydende på cellevandring (VII-VIII).

Pseudoendotelet dannes fra andre celletyper end endotel, sandsynligst fra modificerede SMC som led i repopulation af neointima med celler fra lumenale media (VII-VIII). Der er jævne overgange mellem tenformede SMC og typisk pseudoendotel (VI, jf. p. 66) og TEM af typisk pseudoendotel viser træk fælles med SMC (VII-VIII, jf. p. 73). Pseudoendotelets pleomorfe sølvlinjemønstre med "øjler" (III-VI) kan skyldes sølvudfældninger imellem pseudoendotelcellers vilttert forgrenede og interdigiterede randpartier, hvori også indgår udløbere fra underliggende SMC ((VII-VIII, jf. p. 75). Thrombocytter adhærer ikke til pseudoendotel, men frie mononukleære celler er ikke sjældne; hvorvidt disse bidrager til dannelsen af pseudoendotel, er uvist (III).

Cellemønstrenes morfologi viste afhængighed af overfladernes niveau (III). Både EC og pseudoendotel var hyppigt polariseret vinkelret på karrets længdeakse som islet i hvirvlede mønstre relateret til overflader med lister, kamme og ekskavationer (III). Hemodynamiske påvirkninger udløst af ujævnheder i overfladen kan forklare cellernes polarisering (III).

Noradrenalinlæsion af aorta thoracica (IV-V)

Materiale og metoder (IV, V)

Forsøgsdyrene var hanlige albinokaniner af dansk landrace, 5 mdr. gamle og 3 kg legemsvægt.

Noradrenalin injiceres intravenøst efter Helins metode (Helin et al. 1970a). Noradrenalin i en dosis af 1 mg injiceres en gang dagligt gennem ørene i løbet af to perioder á 15 minutter med et interval på 5 minutter. (Noradrenalin bitartrate 100 mg opløses i 100 ml fysiologisk saltvand indeholdende 5000 U heparin. Injektionshastighed af automatisk pumpe var 4 ml/h, sv.t. 66,6 µg noradrenalin bitartrate = 33,3 µg noradrenalin/min. Den totale daglige dosis var 1 mg, og den totale daglige injektionsperiode 30 min.). Kontrolldyrene injiceres på samme måde med fysiologisk saltvand i stedet for noradrenalin.

I første forsøg (IV) omfattende 23 dyr (12 forsøgsdyr og 11 kontrolldyr) gives én daglig injektion i 14 dage, og autopsi foretages 17. dag (IV, Table 1).

I andet forsøg (V) omfattende 44 dyr (35 forsøgsdyr og 9 kontrolldyr) varieres antallet af injektioner og overlevelsestid (V, Table 1). Efter antallet af injektioner deles forsøgsmaterialet i tre grupper. Gruppe I: 1 injektion á 1 mg. Gruppe II: 2 injektioner i.e. 1 mg dgl. i 2 på hinanden følgende dage. Gruppe III. 3 injektioner i.e. 1 mg dgl. i 3 på hinanden følgende dage. Overlevelses-

tiden varieres. Gruppe I: 1-7-14 dage efter injektionen. Gruppe II: 1-6-13 dage efter sidste injektion. Gruppe III: 1-5-12 dage efter sidste injektion (jf. V, Table 1).

Autopsi, perfusionssølvfarvning og fikstation foretages som i tidligere forsøg (I, II, p. 11). I første forsøg (IV) sølvfarves alle 23 dyr, i andet forsøg (V) sølvfarves 35 dyr, og 9 præpareres uden sølvfarvning.

Excision af præparater (V, fig. 1) er ens i de to forsøg (IV, V): annulære segmenter 8 mm lange anvendes til SEM, 2 fra cephal og 2 fra caudale halvdel af aorta thoracica i.e. i alt 8 halvcylindre til SEM. Fra midtersegmentet præpareres væv til aralditindlejring og farvning af halvtynede snit med toluidinblåt og resten af aorta præpareres til overfladelysmikroskopi som whole-mount præparater (p. 28).

Blodtryksmålinger (IV) udføres på to dyr med kanyler i ørets central arterie, og hos ét dyr med kateter i aorta thoracica introduceret via laparotomi gennem aorta abdominalis. Katetrene fyldt med hepariniseret saltvand var forbundne med en EMT 34 trykmåler, og trykkurver blev tegnet med Mingograf 34, Elema-Schönander AB.

Endotelets reaktion på noradrenalin i toksiske doser belyst ved SEM og lysmikroskopi

Observationer

Blodtryksmålingerne viste, at det arterielle tryk ved noradrenalininjektion steg fra det normale 100/80 mm Hg til omkring 250/150 i løbet af få minutter og holdt sig på dette niveau i hele første 15 minutters periode. I 5 minutters pausen faldt trykket til normalværdi i løbet af et par minutter, og anden 15 minutters injektionsperiode viste samme trykændringer som første.

Noradrenalininjektionerne bragte dyrene i en comatøs tilstand,

nu og da afbrudt af excitation og lungeødem, som i første forsøg (IV) havde fatalt udfald i 13 tilfælde. Vægttab var fremtrædende i første forsøg (IV) og i begge forsøg (IV, V) var hydrothorax og ascites til stede ved autopsi.

I kontrolmaterialet var dyrene generelt upåvirkede af injektionerne af fysiologisk saltvand, og alle organer inklusive aortae var makroskopisk normale.

I forsøgsmaterialet var aortae stærkere forandrede i første forsøg (IV: 12 dyr), idet 9 aortae foruden dilatation fremviste konfluerende hvidlige plaques, bønneformede ekskavationer og spredte forkalkninger, mens 3 aortae alene var dilaterede. I andet forsøg (V) var de makroskopiske forandringer mindre fremtrædende, idet 4 aortae var normale, 14 alene dilaterede, og 17 fremviste varierende makroskopiske forandringer som ovenfor.

Kvalitative forandringer (IV, tabel 1, V, fig. 4 og 5).

SEM og overfladelysmikroskopi af kontrolmaterialet (IV, fig. 1a og fig. 2) bekræftede tidligere observationer af normalt aortavæv (I, II, III, VI), fraset sporadisk optræden af hexagonalt endotel hos to dyr ved lysmikroskopi (jf. IV, table 1).

Forsøgsmaterialet præsenterede i begge forsøg overvejende normal intima (V, fig. 2a). Hexagonalt endotel forekom udbredt, og som forandring ikke observeret i tidligere forsøg observeredes sølvbindende celler og enkelte uklassificerbare forandringer.

Hexagonalt endotel var fremtrædende i områder med dilatation og makroskopiske forandringer (jf. p. 30). Det dækkede typisk elevationer og ekskavationer (IV, fig. 3a), sølvlinjerne var ensartet tykke og eleverede (IV, fig. 3b og c), kernekonturer ofte tydelige (IV, fig. 3a og c) og bizare "jig-saw lignende" mønstre var hyppige (IV, fig. 3b). Cellernes overflade præsenterede små rundagtige protrusioner (IV, fig. 3c, V, fig. 2b). Ved overfladelysmikroskopi (IV, fig. 1b) var sølvlinjerne ensartet tykke og

ligeforløbende, og et fint støvlignende præcipitat af sølv dækkede overfladen.

Sølvbindende EC optrådte udelukkende hos noradrenalininjicerede dyr og observeredes både i områder dækket af normalt endotel (IV, fig. 1c, fig. 4b og d), og i området af hexagonalt endotel (IV, fig. 4a og c, V, fig. 2c). Udbredningen af forandringen varierede fra sporadisk optrædende solitære celler til konfluente hobe af sølvbindende celler (IV, fig. 1c, fig. 4a-c). Ved SEM var celleoverfladen stærkt reflekterende (lys) og foldet i vekslende grad (IV, fig. 4d og e), og cellelegemerne syntest mindre end nabocellerne. Kernerne i de sølvbindende celler fremstod ved lysmikroskopi som kornede lyse legemer, mens resten af cellen var kraftigt brunfarvet. (IV, fig. 1c). Ved SEM var kernerne oftest synlige, ovale og let eleverede (IV, fig. 4e, V, fig. 2c).

Uklassificerbare forandringer var sporadiske observationer i første arbejde (IV), som ikke lod sig registrere og klassificere ved både SEM og lysmikroskopi. Ved lysmikroskopi observeredes lige hyppigt i forsøgs- og kontrolmaterialet breddeforøgede sølvlinjer isprængt grove uens store nodøse fortykkelser (IV, fig. 1d). Ingen tilsvarende forandring observeredes ved SEM. I forsøgsmaterialet observeredes med SEM enkelte steder bizare stellate dannelser ved sølvlinjernes mødesteder ud for cellers poler (IV, fig. 5a og b), og diskrete områder med svigtende sølvfarvning, hobe "erythrocyt-skygger" og diskrete ansamlinger af amorf trådet substans blev registreret (IV, fig. 6a og b).

Transmissions-lysmikroskopi af tynde snit fra aralditindlejret væv farvet med toluidinblåt viste overensstemmende med Lorenzen (1963a og b) og Helin et al. (1970a) intimal fortykkelse, øget interlaminær substans i media, fokale nekroser i lumenale del af media med rundcelleinfiltration. I præparater med ekstensiv medianekrose var vægtykkelsen reduceret med strækning af de elastiske membraner. Histologiske, histokemiske og biokemiske forandringer fremgår af oversigtsafhandlinger af C. Garbarsch (1976) og P. Helin (1977).

Semikvantitative analyser (V)

I andet forsøg (V) forsøges kvantitering af de reproducerbare forandringer ved en face studier: hexagonalt endotel og sølvbindende celler (V, fig. 4). Ved SEM registreres på 27 sølvfarvede forsøgsdyr antallet af aorta halvcyindre (V, fig. 1) med forandring (maksimalt 8 pr. dyr), og ved overfladelysmikroskopi registreres på 24 sølvfarvede forsøgsdyr middelværdien af pct. synsfelter med forandring i cephalé og caudale segment. Ved transmissionslysmikroskopi kvantiteres hos 35 forsøgsdyr den neointimale fortykkelse efter antal af cellelag, og nekroser efter antal og tendens til konfluens (V, fig. 5) på to snit, et længde- og et tværsnit pr. mellemsegment (V, fig. 1).

Hexagonalt endotel viste ved SEM og lysmikroskopi (V, fig. 4a og b, venstre halvdel) positiv korrelans til længden af overlevelsestid efter sidste injektion og til antallet af noradrenalin-injektioner. Overlevelsestidens længde korrelerede positivt med øget respons i alle grupper uanset antallet af injektioner. Antallet af noradrenalin injektioner korrelerede med øget respons i grupperne observeret 1 dag og 5-7 dage efter sidste injektion, mens effekten af to og tre injektioner syntes ens for dyr med 12-14 dages overlevelse. Data testet med forskellige statistiske og matematiske standardprocedurer viste ingen statistisk signifikans.

Sølvbindende celler (V, fig. 4c og d: højre halvdel) viste overensstemmelse ved SEM og lysmikroskopi på ét punkt: forandringen dominerede hos engangsinjicerede dyr, uanset autopsi foretages 1, 7 eller 14 dage senere. I grupperne injiceret 2 eller 3 gange var respons svagt, og observationerne ved SEM og lysmikroskopi divergerede. SEM pegede på øget respons med tiltagende længde af observationstiden, mens lysmikroskopi viste nærmest negativ respons hos dyr behandlet med to eller tre injektioner.

Alle aortae med sølvbindende celler frembød også hexagonalt endotel. Men læsionerne var separate, og kun hos to engangsinjicerede

dyr var sølvbindende celler til stede i mønsteret af hexagonalt endotel.

Intimafortykkelse og medianekroser (V, fig. 5) øgedes tydeligt med længden af overlevelsestid, mens antallet af noradrenalinlæsioner syntes at betyde mindre. Med få undtagelser var begge forandringer til stede samtidigt.

Diskussion

Gentagne adrenalininjektioner fremkalder makroskopiske arteriosclerotiske forandringer i aorta (Josué 1903). Læsionerne omfatter distorsion og nekroser af elastisk væv i luminale zone af media, inflammatoriske reaktioner, øget mængde af amorf intercellulærsubstans samt intimal hyperplasi. Forandringerne ligner mere Mönckebergs mediasclerose i ekstremitetskar (Mönckeberg 1903) end human atherosclerose (Marchand 1904).

Læsionen blev først beskrevet af Josué (1903 og 1905), og siden er læsioner af arterier, udløst med adrenalin, ekstensivt undersøgt (Braun 1907, Anitschkow 1933, Lange 1924, Friedman et al. 1955, Oester 1959, Lorenzen 1959 og 1963a og b, Yu & Blumenthal 1965, Cavallero et al. 1972). Noradrenalin i mindre doser end i nærværende forsøg (IV, V) har ikke medført tydelige morfologiske ændringer i karvæggen (Oester 1959, Lorenzen 1963b, Yu & Blumenthal 1965), men injiceret intravenøst i gentagne toksiske doser kan noradrenalin (Helin et al. 1970a) fremkalde makroskopiske og histologiske forandringer af samme type som adrenalin.

De biokemiske ændringer er kvalitativt de samme, som udløses ved adrenalin (Lorenzen 1963a og b) og ved gentagne perioder af systemisk hypoxi (Helin & Lorenzen 1969, Garbarsch et al. 1969, Helin et al. 1969) og ved mekanisk læsion af aortavæggen (Helin et al. 1971a og b). Forandringerne er tolket som uspecifikke reparative processer og tyder på, at karvæggen reagerer ensartet på forskellige former for beskadigelse (Lorenzen 1963b og 1973, Garbarsch 1976 og Helin 1977).

Den patogenetiske mekanisme ved noradrenalinlæsionen er ukendt. Hypertension kan beskadige karvæggen ved en mekanisk belastning, sammenhængende med pludselige ændringer i trykket (Lorenzen 1963a) eller ved dilatationsvirkning med kinking af aortavæggen af samme art som ved eksposition for generel hypoxi (Helin & Lorenzen 1969). En toksisk effekt på karvæggen af adrenalin er påvist af Stief & Tokay (1935), Oester (1959) og af Friedman et al. (1955) ved indgift af noradrenalin. En direkte metabolisk virkning af noradrenalin på SMC er mulig. Hypoxi er konstateret ved direkte måling af ilttension i tunica media af a. femoralis under noradrenalin-virkning (Moss et al. 1969) og skyldes muligvis en direkte metabolisk effekt på SMC medførende et for stort iltforbrug. Forandringer i serumlipider og i aortavæggens lipidsyntese har også været formodede patogenetiske faktorer ved arteriebeskadigelse af katecholaminer (Dury & Moss 1954).

Endotelets reaktion på katecholaminer er sparsomt undersøgt ved en face studier. Sunaga et al. (1969b), Shimamoto et al. (1971) påviste med SEM en ødematøs reaktion med forandringer i intimas relief, herunder markante ændringer i "intercellularbroerne" efter små doser adrenalin og satte forandringerne i forbindelse med øget permeabilitet af EC (Shimamoto & Sunaga 1962). Toksiske doser noradrenalin fremkalder ødem af underliggende væv i forbindelse med åbning af EC's junctions (Constantinides 1972), en virkning der ligner den kontraktile virkning af vasoaktive substanser på EC (Majno & Palade 1961, Robertson & Khairallah 1972). Ved perfusion af kaninens aorta abdominalis in situ med graderede ufysiologiske doser adrenalin og noradrenalin påviste Hoff & Gottlob (1967) EC-beskadigelse varierende fra svulst af mitochondrier og endoplasmatisk reticulum til cytoplasmatiske protrusioner, vesikeldannelse og cytolyse. Burri & Weibel (1968) påviser ved morfometrisk metode, at adrenalin nedsætter EC's indhold af Weibel Palade bodies. Kobayashi (1969) påviste ved TEM ringe påvirkning af EC ved adrenalin og thyroxin, men markante ændringer i SMC og bindevæv.

SEM studier af forsøgsmodeller, der ligner nærværende noradrenalinforsøg (Sunaga et al. 1969b, Kjeldsen et al. 1972) lader sig imidlertid ikke direkte sammenligne med nærværende studier (IV, V). Sunaga et al. (1969b) anvender små doser adrenalin, sølvfarver ikke og observerer ødematøse reaktioner, som ikke ses i nærværende studier. Kjeldsen et al. (1972) påviser ødematøse reaktioner ved kuliltepåvirkning og beskriver reliefændringer i aorta, som ikke genkendes i nærværende studier, og heller ikke de af Nelson et al. (1975) beskrevne "crater-like defects" i EC's cytoplasma, fremkaldt af ischæmi, blev genkendt i nærværende studie.

SEM studier af aorta thoracica efter noradrenalinpåvirkning (IV, V) lod sig derimod direkte sammenligne med observationerne i ballonforsøget (III) og med EC forandringer i forsøg baseret på toxinvirkning, hypercholesterolemi og stress (se nedenfor p. 49). I lighed med observationerne i ballonforsøget (III) optrådte hexagonalt endotel i jævne overgange til normalt endotel i noradrenalin-forsøgene (IV, V), mens pseudoendotel ikke forekom. Sølvbindende celler optrådte i noradrenalinforsøget (IV, V), men blev aldrig observeret i ballonforsøget (III).

Hexagonalt endotel repræsenterede i nærværende studier (IV, V) genuint endotel ligesom i ballonforsøgene (III, VI). Dets rolle i forbindelse med dilatation af karvæggen, niveauforskelle i overfladen og påvirkning af hemodynamisk stress er sandsynligt den samme som i ballonforsøget (jf. p. 34). Endoteldefekter af større omfang, denuderede flader og pseudoendotel forekom ikke i noradrenalinforsøgene (IV, V). Betydningen af hexagonalt endotel er derfor næppe kompensation for tab af EC i stort omfang, som tilfældet var i ballonforsøgene (III, VI), men sandsynligt en adaptation til øget overflade (jf. p. 50).

Sølvbindende EC lignede beskadigede celler (Zinner & Gottlob 1961) og/eller nydannede celler efter hårdt mekanisk traume (Gottlob & Zinner 1962) og var morfologisk identiske med argy-

rofile celler efter endotoxinpåvirkning (Gerrity et al. 1976, Reidy & Bowyer 1977b og c), eksperimentel atheromatose (Goode et al. 1977) og ikke veldefinerede stresspåvirkninger af normale dyr (Bowyer et al. 1977). Ifølge Zinner & Gottlob (1961) skyldes det karakteristiske udseende af sølvbindende EC med "Kernausparungen", at plasmamembranens permeabilitet øges, mens kerne-membranen forbliver impermeabel. Under helingen af hårdt traume (Gottlob & Zinner 1962) er udseendet af beskadigede og nydannede celler ens, idet begge typer er permeable for sølv. Gerrity et al. (1976) formoder, at de sølvbindende celler er akut beskadigede af toksin og afstødes i samme områder af aortavæggen, hvor optagelse af Evans blue, turnover og vulnerabilitet er øget. Reidy & Bowyer (1977 b og c) anser det for mest sandsynligt, at argyrofile celler optrædende et par uger efter toksininjektion er regenererende EC. Goode et al. (1977) observerer argyrofile EC som initiale fokale EC-forandringer ved eksperimentel atherosclerose, optrædende før eleverede fatty streaks opstod, men stiller spørgsmålet åbent, om argyrofile EC er beskadigede celler in situ eller nydannede celler. Forf. bemærker, at EC i randen af prolifererende endotel efter ballonlæsion i vore forsøg (III) ikke var argyrofile.

I noradrenalinforsøgene (IV, V) lod spørgsmålet om de argyrofile cellers vitalitet sig ikke afgøre. Nogle celler så skrumpne og devitaliserede ud (IV), andre optrådte parvis i klynger og kunne give indtryk af afsluttet celledeling (V). Forandringernes multifokale fordeling peger på, at noradrenalinets beskadigende og/eller proliferative stimulus rammer celler/cellegrupper, som af ukendte grunde er modtagelige herfor. Forandringernes fordeling kan være resultatet af et samspil mellem sensibiliserende faser i cellernes livscyklus, f.eks. turnover og lokaliserende faktorer i traumets indvirkning f.eks. segmentale dilatationer eller konstriktioner (Helin & Lorenzen 1969) og vekslende fordeling af hemodynamiske påvirkninger (Fry 1968, 1972 og 1973, Flaherty et al. 1972a, Fallon & Stehbens 1973, Caplan & Schwartz 1973) sekundære til niveauændringer i intima udløst af forandringerne i

media. Bowyer et al. (1977) bemærker, at der hos normale dyr var høj frekvens af argyrofile celler i tilslutning til transport til afdelingen, og Collatz Christensen (1975, ikke publiceret observation) iagttog samme fænomen ved metodestudier på aorta udtaget fra kaniner på slagteri. Betydningen af disse iagttagelser unddrages tolkning, men implicerer måske signifikante sammenhænge mellem stressfaktorer og EC's labilitet (jf. stress faktorer og pseudoendotel p. 57).

Uklassificerbare forandringer (p. 44) uden overensstemmelse mellem SEM og lysmikroskopi, og sporadiske observationer af stærkt skrumpede uidentificerede cellulære elementer unddrager sig tolkning.

De semikvantitative analyser pegede på, at hexagonalt endotel, media nekroser og intimal hyperplasi optræder nogenlunde samtidigt, positivt korreleret til overlevelsesperioden og i mindre grad til antallet af noradrenalininjektioner. Forandringens mindre afhængighed af gentagne injektioner kan skyldes, at karvæggens reaktivitet nedsættes ved gentagelse af traumet. Nekroser med tab af elastisk væv og bindevævsforandringer i karvæggen (Lorenzen 1959 og 1963a og b, Helin et al. 1970a) medfører svækelse af væggen, dilatation og arteriosclerotiske forandringer og øgning af intimas fladeareal i lighed med virkningen af systemisk hypoxi (Helin & Lorenzen 1969). Det hexagonale endotels korrelans til disse forandringer kan skyldes adaptation til den øgede overflade, ændret relief af intima og påvirkning med hemodynamiske påvirkninger. Endotelets adaptation til ændret overflade kan bero på simpel dilatation (p. 34) eller på proliferation med øgning af EC's antal.

De sølvbindende cellers tydelige korrelans til eksperimenter baseret på én noradrenalininjektion, relative uafhængighed af overlevelsestiden og forholdsvis sjældne forekomst ved gentagne injektioner lod sig ikke tolke.

Spørgsmålet om indbyrdes sammenhæng mellem hexagonalt endotel og sølvbindende celler kunne ikke direkte besvares. Koincidens af forandringerne var tydelig og en fælles patogenetisk mekanisme er mulig. Men de fleste iagttagelser taler imod, at forandringerne er indbyrdes afhængige. Hexagonalt endotel forekom udbredt, sølvbindende EC optrådte diskret; i samme aorta optrådte forandringerne som regel topografisk adskilte, og de viste forskellig korrelans til overlevelsestid og antal injektioner. Sølvbindende EC er således næppe forløbere for hexagonalt endotel.

En mulighed for interrelation ligger i, at hexagonalt endotel er en proliferativ forandring, som kompenserer tab af EC repræsenteret af de sølvbindende celler. Gerrity et al. (1976) påviser desquamerede EC i blodet som en akut kortvarig effekt af injektion af endotoxin, og forf. betragter de sølvbindende celler som devitaliserede i en tilstand af desquamation. Sølvbindende celler kunne i nærværende forsøg (IV, V) spille samme rolle, og turn-over være stor. Men den forskellige udbredning og topografiske fordeling af de to forandringer og den forskellige afhængighed af overlevelsestid og antal af injektioner taler fortsat mest imod denne forklaring.

Forskelle mellem noradrenalinlæsionen og ballonlæsionen

Sammenligning mellem endotelets reaktion i noradrenalinforsøget og ballonforsøget viser én ensartet reaktion: hexagonalt endotel i jævn overgang til polariseret og normalt endotel. Forskelle i observationerne relaterer til læsionernes induktion, næppe til karvæggenes reaktionsmønster. Ved den mekaniske læsion deendotelialiseres store områder, og pseudoendotel, udviklet fra modificerede SMC, deltager i overfladedannelsen. Forklaringen er sandsynligvis, at endoteldefekten er så stor, at EC ikke i løbet af første uge kan dække defekten. Pseudoendotel er patofysiologisk irrelevant, idet meget få eller ingen patologiske processer in vivo vil medføre så store endoteldefekter, at betingelsen for optræden af pseudoendotel er til stede.

Ved noradrenalinlæsionen optræder sølvbindende celler, hvilket ikke blev observeret i ballonforsøgene. Deres optræden hænger formentlig direkte sammen med noradrenalinindgift, idet mange forhold iøvrigt er ens i de to forsøgsmodeller: medialæsion, nekroser, intimal hyperplasi, makroskopiske arteriosclerotiske forandringer. Argyrofile cellers optræden er muligt betinget af samspil mellem sensibiliserende faktorer i EC's livscyklus kombineret med indvirkningen af lokaliserende faktorer i traumets impact (jf. p. 49).

Konklusion

Hexagonalt endotel var en fremtrædende forandring i noradrenalin-forsøget, korreleret til overlevelsestid og antal injektioner. Hexagonalt endotel var inkorporeret i den klassiske reaktion på noradrenalinbeskadigelse sammen med nekroser, neointimal hyperplasi og arteriosclerotiske forandringer og viste som disse ensartet korrelans til overlevelsestid og dosis. Hexagonalt endotel var genuint endotel adapteret til lokal og generel dilatation af karvæggen og til niveauændringer i overfladen. Det udtrykker muligvis mekanisk adaptation til ændret overflade, men kan være resultatet af hemodynamiske påvirkninger og/eller repræsentere proliferativ aktivitet i EC.

De sølvbindende celler optrådte som multifokal diskret forandring, og det forblev uvist, om disse celler var beskadigede/døde eller prolifererende celler, eller begge dele. De var på ukendt måde korreleret til engangsinjicerede dyr, og modsat hexagonalt endotel tydede intet på korrelans til overlevelsestid eller til udviklingen af de øvrige forandringer. Optræden af sølvbindende celler er muligt en direkte virkning af noradrenalin, betinget af samvirkende faktorer som EC's modtagelighed for noradrenalinets beskadigende og/eller vækststimulerende effekt og indflydelsen af "lokaliserende faktorer" i forbindelse med hypertension, kontraktion af karret og makroskopiske forandringer. Intet tyder afgørende på direkte sammenhæng mellem sølvbindende celler og hexagonalt endotel, og de fleste indicier peger på, at de er indbyrdes uafhængige forandringer.

Valg af forsøgsmodel til følgende studier

Sammenligning mellem noradrenalinlæsion og ballonlæsion peger på, at intimas reaktionsmåde er ensartet, og at forskelle kan henføres til induktionsmåden. Hexagonalt endotel optrædende sammen med reparative og arteriosclerotiske forandringer var fælles for de to forsøgsmodeller. Pseudoendotel ("foam-like patterns") optrådte kun i ballonlæsionen og skyldes modificerede SMC, som indgår i overfladedannelsen, når deendotelialiseringen er ekstensiv. Pseudoendotel er en patofysiologisk irrelevant forandring. Sølvsbindende celler blev aldrig observeret i ballonforsøget og skyldes formentlig en direkte virkning af noradrenalin, i.e. en EC reaktion på direkte skade eller stimulation. Reaktionsmåden er formentlig uspecifik, idet andre forf. har påvist, at toksiner, hypercholesterolæmi og "stress" kan udløse samme forandring. Fælles led i denne virkningsmekanisme er ukendte.

Forsøgsmodellerne åbnede forskellige forskningsaspekter. Ballonlæsionen giver mulighed for studie af almene helingsreaktioner på kendte tidspunkter efter engangstraume. Helingsprocessernes forløb i områder dækket af EC kunne sammenlignes med områder, ikke dækket af EC, forventes at give direkte information om EC's indflydelse på helingsprocesserne i bindevævet.

Noradrenalinmodellen giver muligheder for studie af samme almene reaktionsmønstre som ballonlæsionen. Men virkningsmekanismen er sammensat og tidspunkterne for beskadigelse er ikke nøjagtigt kendte. De sølvbindende celler åbner aspekter i udforskningen af lokaliserende faktorer i atherogenesen, men implicerer sammenhænge, som p.t. er ukendte m.h.t. EC's modtagelighed for påvirkning. Ukendte er således virkningsmekanismen på cellulært plan mellem noradrenalin og EC, og virkningsmekanismen af andre faktorer, f.eks. hemodynamik og hypertension, er meget komplicerede. Ballonlæsionen blev valgt som bedst egnede forsøgsmodel til videre studier af EC's rolle i karvæggens almene reparative respons.

KAPITEL III

Endotelets rolle i helingen af aorta efter ballonlæsion

Vitalfarvning med Evans blue korreleret med overfladelysmikroskopi og med transmissions-elektronmikroskopi (TEM).

Introduktion

1. Endotelbeskadigelse og proliferation af SMC

En atherogenese teori ("den myogene teori")

Endotelbeskadigelse, ændret permeabilitet og proliferation af SMC har afgørende betydning i atherogenesen.

På grundlag af eksperimentelle studier over helingen af en mekanisk læsion (Stemerman & Ross 1972), over virkningen af homocystinemi (Harker et al. 1976) og af hyperlipidemi (Ross & Harker 1976) har Ross & Glomset (1973 og 1974) og Ross & Harker (1976) modificeret tidligere fremsatte teorier om atherogenesen (Duncan 1963, French 1966, Haust 1970 og Virchow 1856).

Ifølge Ross og Glomset (1974) kan "vedvarende eller intermitterende beskadigelse af endotelet s.f.a. lokalt hemodynamisk stress eller antigen-antistof komplekser (Minick et al. 1966) ændre endotelets permeabilitet, hvorved diffusion af plasmaproteiner fra arterielumen til intima øges. Under disse forhold vil SMC umiddelbart under membrana elastica interna udsættes for høj koncentration af visse plasmafaktorer, som stimulerer SMC til at migrere ind i intima, proliferere og danne extracellulære bdv.-matrix komponenter". Ifølge McGill (1977) benævnes denne hypotese "myogenic hypothesis" i modsætning til den lipogene hypotese. I overensstemmelse med den myogene teori kan lipoprotein som andre faktorer stimulere SMC's proliferation, men akkumulation af lipid intracellulært og senere også extracellulært anses for sekundære forandringer.

Forsøgene med homocystinemi (Harker et al. 1976) og hyperlipidemi

(Ross & Harker 1976) viste focal desquamation af endotel, intimal hyperplasi, og i forsøget med hyperlipidemi lipidakkumulation, samt i begge forsøg øget thrombocythenfald korreleret til omfanget af deendotelialisering. Forff. tillagde adgang til karvæggen af en "platelet releasing factor" betydning for proliferation af SMC, idet thrombocythæmmende stoffer eliminerede det proliferative response (Harker et al. 1976).

Som indicium på thrombocytters betydning fremhæves også, at en platelet factor havde stimulerende virkning på SMC's deling i in vitro forsøg (Rutherford & Ross 1976). Endotelcellerne har ifølge forff. betydning ved at danne barriere for passage af plasmaproteiner, og den vigtigste effekt af hemodynamiske og andre faktorer, som beskadiger endotelet, er nedsættelse af dets barrierefunktion (Ross & Glomset 1973).

Reendotelialisering

Ved heling af endoteldefekter dannes efter nugældende opfattelse ny EC ved proliferation af i forvejen eksisterende endotel (Poole et al. 1958, Buck 1963, Poole et al. 1971, "III", Webster et al. 1974a og b, Schwartz et al. 1975, Fishman et al. 1975, "VI", "VII-VIII", Clowes & Karnovsky 1977 a og b, Stemerman et al. 1977, Clowes et al. 1978), selv om indicier på blodbårne cellers omdannelse til EC har været diskuteret (Majno 1965, French 1966, Veress et al. 1969, Poole et al. 1971, Glagov & Ts'ao 1975). Endotelets heling synes at bero på forskellige mekanismer delvis adskilt i sekvenser. Ifølge Poole et al. (1958) sker i de første døgn en separation, affladning og ekspansion af EC fra randen af intakt endotel efterfulgt af mitoser i endotel tæt ved randen (p. 34 og 37). In vitro forsøg med explants fra deendotelialiseret aorta har bekræftet separation og ekspansion af randstillede endotelceller ("2", Buck 1977), og i postkonfluente kulturer (Sholley et al. 1977) repareres lineære defekter ved to separate mekanismer, migration og proliferation. Ved helingen in vivo af en cirkumskript lineær læsion af aortas intima (Hirsch & Robertson 1977) sker successivt adhæsion af thrombocytter, optræden af plumpe EC og disses udbredning fra intakt endotel over defekten, pro-

liferation og konfluens senere fulgt af remodellering af celledmønstreret og ophævet permeabilitet for Evans blue og sølv. Forfatteren heri en parallel til observationerne i Sholleys et al.'s forsøg (1977) og formoder, at vigtige metaboliske og patogenetiske aspekter kan være knyttet til sekvenser og faser i endotelets reparation (p. 37 og 81).

SMC's proliferative respons

SMC's deltagelse i de reparative processer (Haust et al. 1960, Buck 1961 og 1963, Backwinkel et al. 1973) består i en sekvens af forandringer begyndende i lumenale media med mitoser, dedifferentiering, vandring gennem fenestra i membrana elastica interna, repopulering af intima, fortsat deling her, efterfulgt af sekretorisk virksomhed med dannelse af extracellulær matrix og endelig afsluttet med redifferentiering til SMC af typisk udseende ved TEM (Poole et al. 1971, Webster 1974a og b, Ross & Glomset 1974, Ross & Harker 1976, Glagov & Ts'ao 1975, Knieriem et al. 1973, Stemerman & Ross 1972, Schwartz et al. 1975, Spaet et al. 1975, Fishman et al. 1975, Clowes & Karnovsky 1977a og b, Clowes et al. 1978). Studier af SMC i kar (se ovenfor) og i in vitro forsøg (Schwarz 1959, Ross & Klebanoff 1971, Ross 1971, Moskalewski et al. 1976, Hinek & Thyberg 1977) har dokumenteret, at SMC er en bindevævsdannende mesenchymal celle på linje med fibroblaster, osteocytter og chondrocytter (Haust et al. 1960, Wissler 1968, Wolinsky 1973, Wight & Ross 1975).

Samtidige reaktioner i helingsforløbet: reendotelialisering og proliferation af SMC

Det er uafklaret, hvorvidt reendotelialisering og proliferation af SMC er indbyrdes uafhængige processer ud over at EC har betydning for intimas metabolisme ved at indgå i den intime barriere (Stemerman & Ross 1972, Ross & Glomsett 1973, Fishman et al. 1975, Spaet et al. 1975, Schwartz et al. 1975, Stemerman et al. 1977). Reendotelialisering af en neointimal hyperplasi udløst af en mekanisk læsion ledsages efter mdr. af regression af den neointimale fortykkelse (Björkerud 1969, Björkerud & Bondjers 1971b, Fishman et al. 1975) uden at være en forudsætning for regressionen

(Stemerman et al. 1977). Det er således uvist, om den med re-
endotelialisering følgende regression af den neointimale hyper-
plasi kan forklares ved eksklusion af platelet factor (Clowes
& Karnovsky 1977a). En påvirkning "den anden vej" af SMC og
bdv. i neointima på endotelets regeneration er også mulig
(Schwartz et al. 1975). Reendotelialiseringens afhængighed
af det anvendte traumes dybde og retning (Björkerud 1969, Björke-
rud & Bondjers 1971b) kunne tyde på, at det underliggende binde-
vævs tilstand har betydning for endotelets proliferation. Hepa-
rin hæmmer SMC's proliferation i beskadigede kar, og uspecifikke
stress faktorer i forbindelse med forsøgsomstændighederne som
permanent infusion gennem venekateter (Clowes & Karnovsky 1977b)
eller saltvandsinjektion subcutant (Clowes et al. 1978) hæmmer re-
endotelialisering og medfører, at SMC temporært danner overflade
i.e. pseudoendotel (jf. påvirkning af endotel med uspecifikke
stress faktorer p. 50).

2. Vitalfarvning af aorta med Evans blue

Kolloide farvestoffer farver aorta uens, og laderede områder viser
øget farvebinding (Petroff 1923, Okuneff 1926, Glasunow 1926).
Petroff (1923) viste, at trypanblåt og lithiumkarmin i.v. farvede
rottens og kaninens aorta fra intima- og adventitiasiden, og at
en kemisk irritation af karvæggen øgede farvningen. Okuneff (1926)
foretog vitalfarvning med trypanblåt og observerede øget farvning
de steder, hvor fedt aflejres spontant hos mennesker og hos for-
søgsdyr efter fedtfodring. Forf. deducerede, at fedtstof og kolloid
farve trængte ind i karvæggen ved samme mekanisme, og at årsagen
kunne være farvens indtrængen de steder, "wo der Durchtränkungs-
strom der Blutlymphe am stärksten ausgeprägt ist". Om årsagerne
dertil antog forf., at mekaniske faktorer, forhold i blodstrøm-
men eller forskellig fordeling af "lymfens" drænageveje kan være
forklaringen. Glasunow (1926) påviser ved supravitalfarvning af
aorta med trypanblåt pletformet farveoptagelse og farvning af
longitudinelle striber, og mekanisk og termisk beskadigelse gav
øget farveoptagelse. Forf. forklarer observationen ved forskellig
permeabilitet af karvæggen og sætter denne i forbindelse med
fysisk-kemiske ændringer.

Evans blue, injiceret intravenøst, bindes til albumin, og farvningen af vævet sker ved et protein-farve kompleks (McGill et al. 1957, Packham et al. 1967, Heck et al. 1976). Farve-proteinkomplekset trænger i ekstracranielle kar ind både fra intimasiden og fra adventitia og vasa vasorum (Heck et al. 1976). Evans blue har stor affinitet til elastin (McGill et al. 1957) og kan påvises i karvæggen ved en følsom metode baseret på fluorescensmikr. (Steinwall & Klatzo 1966). Ifølge Fry (1973) transporteres stoffet ind i karvæggen som farve-albumin kompleks og dissocieres, hvorefter farven bindes til vægsubstansen. Farvemethoden frister til overestimering af albuminpassagen, især i områder med endotelbeskadigelse, hvor albuminet har fri adgang ind (medførende farve) og ud af intima (fri for farve) (Fry 1973).

Evans blue farver i det væsentlige ikke den normale aorta, men bestemte områder i arcus, sinus Valsalvae, Bottalli-arret og små områder omkring karforgreningers afgang farves som vist med trypanblåt af Okuneff (1926). Farvede områder (blåt) i aorta viser forskelle til ikke farvede områder (hvidt) m.h.t. permeabilitet og makromolekylers metabolisme, vulnerabilitet for toxiner og cholesteroloftagelse (jf. p. 24). Hemodynamiske faktorer har betydning for den kraftige blåfarvning af eksperimentelle aneurismer og arteriovenøse fistler (Stehbens 1978) og for farvnings lokalisationer i normale kar (Fry 1973). Morfologiske studier af blå og hvide områder i aortavæggen har ikke givet entydige oplysninger til tydning af årsager til forskellene i permeabilitet. Intimas sølvlinjemønstre korreleret med vitalfarvning med Evans blue (Caplan et al. 1974) viste tykkere sølvlinjer og flere gaps i disse i blå område; men observationen bidrog intet til forståelsen af den øgede permeabilitet i farvet område. Gerrity et al. (1977) påviser ved TEM ultrastrukturelle forskelle mellem EC og subendotelialt væv i farvet og ufarvet område af aortavæggen. Endotel i hvidt område adskilte sig fra endotel i blå område ved stærkt interdigiterede cell contacts, prominent Golgikompleks og tykkere rutheniumrødt - positiv glycocalyx, mens forekomsten af tight junctions var ens. Det subendoteliale væv i blå område var fortykket og ødematøst. Andre forsøg viser, at intima kan

være permeabelt for Evans blue uden morfologiske forandringer, og at farvningen med Evans blue giver forskelligt resultat i in vivo og in vitro forsøg (McGill et al. 1957, Bell et al. 1972). Somer et al. (1972) finder ingen morfologiske forskelle på blåt og hvidt område, men hemodynamiske årsager udlægges som forklaring på observation af forskelligt farvemønster in vivo og in vitro, også ved eksperimentel coarctatio aortae (Somer et al. 1972).

Passagevejen for Evans blue proteinkompleks i den normale aorta er uopklaret. Analyser af tracers passage viser, at horseradish peroxidase (HRP) passerer endotelet intercellulært og muligvis også ved vesikulær transport (Florey & Sheppard 1970). Aortavæggens intima viste i sådanne forsøg (Schwartz & Benditt 1972b) permeabilitetsegenskaber fælles med kapillærer i skeletmuskler og myocardium (Florey & Sheppard 1970, Hüttner et al. 1970). Betydningen af intercellulære junctions for endotelets permeabilitet er uafklaret. Muir & Peters (1962) observerer i kapillærer 5-lagede junctions, som de formoder danner en kontinuerlig fascia occludens, og ifølge Stein & Stein (1972) er aortaendotelets junctions impermeable for lactoperoxidase med molekylvægt 82000.

Under helingen af en mekanisk læsion er endotelet først permeabelt, men viser derefter aftagende permeabilitet for Evans blue protein-kompleks (Björkerud & Bondjers 1971a, Hirsch & Robertson 1977, Stemerman et al. 1977, Clowes et al. 1978), og den aftagende permeabilitet for Evans blue og HRP følges ad tidsmæssigt og topografisk i Clowes et al.'s forsøg (1978). Permeabilitetsundersøgelser af helende intima har ikke i ovenomtalte forsøg eller i Webster et al.'s forsøg (1974b) givet forklaring på, hvilke forandringer i den helende intima's endotel, som betinger intima's aftagende permeabilitet. Ifølge Stehbens (1965) kan øget permeabilitet af prolifererende veneendotel skyldes gaps, der opstår ud for cellernes ækvator i telofasen og er synlige som stigmata og stomata.

I arterier indgår ud over EC-laget basalmembran (MB), bindevævs-matrix og elastiske lameller i karvæggens barriere. MB's betyd-

ning som filter for makromolekyler er tydelig i nyrens fenestrerede kapillærer (Palade 1961) og bekræftedes eksperimentelt i venoler ved farmakodynamisk disjunction af EC (Majno & Palade 1961). I lukkede kapillærer i tværstribede muskler (Palade 1961, Bruns & Palade 1968) og i myocardium (Jennings et al. 1962) er MB's barriereeffekt over for makromolekyler ikke entydig, og i aorta, hvor MB har karakteren af et retikulum (rMB), spiller den i Schwartz & Benditt's forsøg (1972b) ingen rolle som morfologisk barriere over for HRP, og nøjere udforskning af dens betydning har været efterlyst (French 1963). Membrana elastica interna udgør en vigtig del af den intime barriere over for passagen af næringsstoffer og metabolitter (Moore & Ruska 1957).

Bindevæv fremkaldt af reparative processer spiller en rolle for permeabiliteten (Helin et al. 1971a, Wight & Ross 1975, Helin 1977). I fibrous plaque (McGill et al. 1957, Friedman & Byers 1963) synes det fibrøse væv at repræsentere en barriere for Evans blue protein kompleks, idet karvæggen er mest permeabel ved randen af den hyperplastiske reaktion.

3. Formål med undersøgelserne

Tre spørgsmål søgtes belyst ved nærværende studier (VI, VII-VIII):

1. Kan der påvises morfologiske ændringer i EC i forbindelse med reetablering af den intime barrierefunktion?
2. Ændres det neointimale bdv. i forbindelse med reendotelialiseringen?
3. Er der indicier på interaction mellem endotel og SMC under afløbet af helingsprocesserne?

Ballonlæsionen kombineret med Evans blue viste sig egnet til belysning af disse spørgsmål. I et pilotforsøg ("1") strækkende sig over 3 uger optrådte endotelialiserede områder som aflange,

ufarvede hvide øer omkring ica, mens denuderet flade og områder dækket af pseudoendotel var kraftigt blåfarvede. TEM viste markante forskelle på morfologien af EC og pseudoendotel særligt tydeligt m.h.t. cell contacts. EC udviklede veldifferentierede junctions i løbet af tre uger, mens cell contacts mellem pseudoendotelceller var inkomplette med åben kommunikation til det underliggende væv.

Reendotelialisering kunne bekvemt overskues i mønsteret og udbredningen af makroskopisk hvidt område og dokumenteres ved foto. Fluorescensmikroskopi (Steinwall & Klatzo 1966 og jf. p. 58) muliggjorde i makroskopisk hvidt område en differentiering mellem partiel og komplet re-etablering af barrierefunktionen. Reendotelialiseringen måtte forventes at strække sig over lang tid (III) og vævsmaterialet ville være rigeligt. Hermed kunne tætliggende biopsier til TEM og fluorescensmikroskopi udtages fra områder, der var reendotelialiseret tidligt tæt ved ica, senere eller sent mellem ica., og fra områder i overgange mellem hvidt og blå, hvor reendotelialiseringen var igangværende. Selv i langvarige forsøg (III) kunne ikke reendotelialiserede områder forventes at være tilgængelige til sammenligning med reendotelialiserede områder.

Forsøgene blev tilrettelagt med sigte på spørgsmålet: Hvilke ændringer sker i aortavæggen på ét og samme sted gennem en lang tidsfølge, når de akutte destruktive forandringer afløses af reparative processer, og en "bølge" af reendotelialisering passerer hen over stedet, mens en samtidig hyperplastisk mesenchymal reaktion afspilles i det underliggende væv?

Materiale og metoder (VI, VII-VIII)

I arbejdet omhandlende vitalfarvning af aorta thoracica korreleret med overfladelysmikroskopi og fluorescensmikroskopi (VI) anvendes 37 hankaniner af dansk landrace. Ballonlæsionen (jf.

III og p. 28) udføres på 29, på 4 udføres skinoperation (jf. III og p. 28), og yderligere 4 dyr anvendes til biokemiske studier af Evans blue i blodet. Autopsi baseret på perfusionsfiksering (II, III, IV, V, p. 11) med buffet 4% formalin udføres med sølvfarvning på 20 dyr, og uden sølvfarvning på 13 dyr, 1-2-4-8-14-21-30-60-180 døgn efter ballonlæsionen, og 21 og 180 dage efter skinoperation.

I arbejdet omhandlende vitalfarvning af aorta thoracica korreleret med TEM (VII-VIII) anvendes 25 hanlige albinokaniner af dansk landrace, 17 med ballonlæsion og 8 skinopererede. Autopsi udføres 1-2-4-8-21-60-200-240 døgn efter ballonlæsion, og 8-21-60-200-240 døgn efter skinoperation ved perfusion med Hanks balanced salt solution (pH 7,2, 285 mOsm) efterfulgt af Karnovsky's fixative 37° C infunderet i 30 minutter, ca. 500 ml (5% glutaraldehyd, 4% paraformaldehyd buffet med 0,1 M cacodylatbuffer, tilsat 5 mM CaCl_2 , pH 7,2, fixative vehicle 300 mOsm).

Vitalfarvning med Evans blue (VI, VII-VIII)

Evans blue (Merck art 3169), 0,5%, i fysiologisk saltvand injiceres gennem mikroporefilter (Millipore GSWPO 2500) i.v. i øre-vene, 3 ml kg/legemsvægt, 3½-4 timer før autopsi ("1", VI, VII-VIII). Koncentrationen i serum af Evans blue bestemmes spektrofotometrisk (Nielsen & Nielsen 1962) til fremstilling af eliminationskurver, og graden af proteinbinding måles ved ultrafiltrering og spektrofotometri (VI). Sammenligning mellem proteinbinding af Evans blue i serum in vivo og in vitro (VI) viste samme høje grad af proteinbinding (98% resp. 96%), og metodestudierne i "VI" indicerede, at det farvende agens i forsøgene var Evans blue proteinkomplex.

Planimetri (VI) udføres på fotos af aorta thoracica i området fra ica II-IX ved excision og vejning, og ufarvet (hvidt) i procent af den totale overflade tages som mål for reendotelialiseringen.

Whole-mount-præparater (VI) til overfladelysmikroskopi fremstilles fra hele intimafladen fraset små flader udnyttet til Häutchen præparater og strimler excideret til transmissions lysmikroskopi (jff. III og p. 28).

Häutchen (VI) udføres ved cellulidinmetoden (Poole et al. 1958) fra små felter i aorta's midterste del, farvning med Harris HE og Feulgen (McManus & Mowry 1964).

Fluorescensmikroskopi (VI, VII-VIII)

foretages på frysesnit og er en følsom indikator på vævsbundet Evans blue, som ved fluorescensmikroskopi udsender en kraftig orange-rød fluorescens (Steinwall & Klatzo 1966, Heck et al. 1976). I "VI" udtages væv fra området mellem 4. og 8. ica, i "VII-VIII" excideres væv tæt ved biopsier til TEM (jff. VII, fig. 1).

Transmissionslysmikroskopi

I "VI" excideres væv fra tilfældigt valgte steder i cephal og caudale 1/3 af kærret og farves med konventionelle kerne- og bindevævsfarvemethoder: hamatoxylin og eosin (McManus & Mowry 1964), v. Gieson Hansen (Romeis 1948), PA-Schiff og orcein (McManus & Mowry 1964), toluidinblåt ved varieret pH (Pearse 1968), von Kossa farvning for kalcifikation (Pearse 1972).

I "VII-VIII" studeres halvtynde snit af væv indlejret i araldit ved farvning med 1% toluidinblåt (IV).

Præparation af vævet til TEM (VII-VIII)

I. Standardprocedure. Vævsblokke fra udvalgte steder excideres (se VII, fig. 1), immersionsfikseres i samme fiksativ (Karnovskys fiksativ, se ovenfor) natten over ved 4°C. Postfiksatation i osmium (2% OsO₄ i cacodylatbuffer, pH 7,2, fiksativ vehicle 300 mOsm) 1-2 h ved 4°C. Skylning i samme buffer, blokfarvning med 1% ura-

nylacetat, dehydrering i acetone, indlejring i Araldite. Ultratynde snit kontrasteres med blycitrat.

II. Simionescu & Simionescu's LMGG metode (low molecular weight galloyl glucose, Simionescu & Simionescu 1976a og b). Efter fiksatation i Karnovsky's fiksativ og osmium skylles i bufferen, og blokke anbringes i 1% lavmolekylær galloylglucose (LMGG) i cacodylatbuffer 0,05 M, pH 7.0 i 30 minutter. Dehydrering i acetone, indlejring i araldit, ultratynde snit kontrasteres med både zinc-uranyl acetat og blycitrat.

I alt udtages til TEM 115 vævsblokke, 80 fra ballonlæsion (32 til standardprocedure, 48 a.m. Simionescu), 35 fra skinopererede dyr (14 til standardprocedure, 21 a.m. Simionescu).

Transmissions lysmikroskopi (VII-VIII) på halvtynede snit farvet med 1% toluidinblåt foretages på samme 115 blokke, som anvendes til TEM, og yderligere på 13 blokke, som ikke blev anvendt til TEM.

Fluorescensmikroskopi (se ovenfor) foretages på frysesnit af vævsblokke excideret på udvalgte steder (se VII, Fig. 1). I alt 108 blokke excideres, 76 fra ballonlæsion og 32 fra skinopererede dyr.

Udvælgelse af væv til undersøgelse (VII-VIII). Væv til TEM og fluorescensmikr. (VII, fig. 1) excideres fra tætliggende og korresponderende steder for at sammenligne ultrastukturen af intima med permeabiliteten for proteinbunden Evans blue. Analysen tilsigtede gennem et langt tidsløb at beskrive de ændringer, som vævet undergik i områder, der blev tidligt reendotelialiserede (ved ica) senere eller sent (mellem ica) eller aldrig reendotelialiserede (fra blåt område ml. ica.). I overgangszoner ml. hvidt og blåt forventedes reendotelialiseringen at være igangværende. Til TEM udtages fra ballonforsøget i alt 80 blokke, 43 ved ica og 37 mellem ica. Transmissions lysmikroskopi uden TEM omfatter 10 blokke, 7 ved ica og 3 mellem ica. Fluorescensmikr. omfatter

76 blokke, 43 ved ica og 33 mellem. Vævsblokke excideret fra makroskopisk synlige overgange ml. hvidt og blå er inkluderet i fig. 1 blandt biopsierne excideret ml. ica: 7 blokke til TEM og fluorescensmikr., 1 blok alene til lysmikroskopi og fluorescensmikroskopi. Yderligere er overgangszoner ml. endotel og pseudoendotel tilfældigt ramt i enkelte biopsier både ved ica og ml. ica i de tidl. forsøg, men i de sene forsøg, 60-240 dage, oftest kun i præparater excideret ml. ica. Fra kontrolmaterialet excideres 35 blokke fordelt som vist i fig. 1.

Observationer (VI, VII-VIII)

Kontroldyrenes aortae var makroskopisk normale i begge forsøg (VI, VII-VIII). Aorta hos forsøgsdyrene var alle dilaterede, tiltagende med længden af overlevelsestiden, og makroskopiske forandringer i overensstemmelse med de af Helin et al. (1971a) beskrevne (p. 29) var til stede hos 12 af 19 dyr i "VI" og hos 6 af 11 dyr i "VII-VIII" i overlevelsesperioden 8 dage og derover.

I. Lysmikroskopi korreleret med vitalfarvning

Vitalfarvning med Evans blue (VI, VII-VIII)

Den makroskopiske farvning af aorta var ensartet i begge forsøg (VI, VII-VIII, VI, fig. 3). Hos kontroldyrene var der ingen farvning af aorta thoracica (VI, fig. 3a) fraset inkonstante diskrete longitudinelle blå striber dorsalt i den cephalé del. I forsøgsmaterialet var billedet ens i de to forsøg (VI, VII-VIII). De første par døgn var aorta thoracica massivt blå. Fjerde dag optrådte små isolerede hvide øer omkring ica (VI, fig. 3b). Efter 8 døgn var disse øer aflange, mest udbredt i caudal retning og parvist af og til sammensmeltede. Hvide striber uafhængige af "øerne" omkring ica var vekslende til stede (VI, fig. 3c). I forsøg med 14-21 dages overlevelse dannede de hvide øer landkortagtige felter af hvidt. De hvide felter var ofte delvis sammensmeltede dorsalt ml. forskellige ica-par, mens blå dannede sam-

menhængende felter ventralt (laterale partier af den ventralt opklippede aorta). Indtil forsøgets slutning ekspanderede hvidt som uregelmæssige landkortagtige partier, og blå optrådte som isolerede øer dels mellem ica dels ventralt i karvæggen (VI, fig. 3d).

Planimetri (VI, fig. 2) viste hurtig ekspansion af hvidt i forsøgets første uger. Efter et halvt år var størstedelen af karret dækket med hvidt, men i alle forsøgsfaser fra og med 8. dag var der stor spredning på observationerne, både i den enkelte forsøgsfase og mellem de forskellige forsøgsfaser.

Overfladelysmikroskopi (VI)

Studiet af sølvfarvede whole-mount-præparater fra 18 dyr og Häutchen fra 25 dyr bekræftede tidligere observationer af sølvlinjemønstret i områder dækket af endotel og pseudoendotel. Evans blue hvide områder var endoteldækkede (VI, fig. 5), mens de blå områder var enten denuderet flade (VI, fig. 4a og b) eller dækket af pseudoendotel (VI, fig. 6a og b). En undtagelse fra denne regel var randpartierne af endoteldækket område. En smal bræmme af blåfarvet endoteldækket væv var tydelig i de skarpe grænsezoner mod pseudoendotel (VI, fig. 4d), og tilsvarende var grænsezoner af endotel mod denuderet flade, hvor endotelcellerne var delvist adskilte og stedvis isolerede, tydeligt blåfarvet. I isolerede tilfælde var områder dækket af endotel af typen hexagonalt endotel med mange stomata svagt blåfarvet (VI, fig. 5c). I forhold til tidl. undersøgelser af sølvfarvede whole-mount-præparater (III) var i forsøgets første uger gradvise overgange ml. tenformede celler og typisk pseudoendotel i blå område mere iøjnefaldende (VI, fig. 4c og 6a). I forsøgets sene faser med fremskreden regression af pseudoendotel var dette synligt som skarpt afgrænsede øer af "foam-like patterns" stedvist forbundne med smalle tanger af pseudoendotel omgivet af en bræmme af blå i tilgrænsende endoteldækket område (VI, fig. 6c). Wholamount-præparater uden sølvfarvning fra 11 forsøgsdyr gav ingen oplysninger om cellemønstrene.

De makroskopiske plaques fremstod som dybtliggende amorfe og granulære lysbrydende felter både under hvidt og blått. Randpartierne var i hvidt ofte svagt blåfarvet, og i blått område stærkere blåfarvet end selve plaques. I sølvfarvede præparater dominerede hexagonalt endotel over plaques i hvidt område, mens plaques i blått var dækket enten af typisk pseudoendotel eller af denude-rede flader.

Häutchen præparater med kernefarvning kombineret med sølvfarvning af endotel i hvidt område viste i områder dækket af normalt ud-seende endotel et regelmæssigt mønster af aflange ovale kerner, stedvist isprængt celler med dobbeltkerner. Polariserede celle-mønstre viste samme udseende. Områder af hexagonalt endotel viste svagt ovale kerner, hyppigt to eller flere i samme celle (VI, fig. 7b), og kernernes størrelse, orientering og farvbarhed vekslede. Kæmpeceller med mere end 5 centralt lejrede kerner optrådte spredt i normalt udseende endotel indtil forsøgets sidste faser, men var hyppigst i og tæt ved randpartierne af endoteldækket område (VI, fig. 7a). Typiske mitosefigurer (anafase) (VI fig. 7a) var meget sjældne og blev i reglen observeret et stykke fra ran-den af endoteldækket område. I blått område viste Häutchen-præpa-rater med kernefarvning jævne overgange mellem tenformede celler med stavformet kerne, formentlig SMC, og aflange bredere celler hyppigt med dobbeltkerner, formentlig pseudoendotelceller.

Thrombotiske forandringer var beskedne bedømt ved wholamount-præparater og Häutchen og i overensstemmelse med tidl. observa-tioner (III, jf. p. 30). Denuderede områder viste pleomorfe fel-ter med vekslende islæt af små stærkt lysbrydende legemer, for-mentlig trombocytter, og "palisade-tegning" af tætliggende ten-formede celler samt fenestrerede elastiske membraner (VI, fig. 4a og b). I områder dækket af endotel og pseudoendotel var celle-overflade og sølvlinjemønstre eneste elementer i overfladen. Ingen mikrothromber var synlige her.

Fluorescensmikroskopi (VI, VII-VIII)

(se VI, fig. 9). Kontroldyr.

Karvæggen viste som helhed grøn fluorescence. De elastiske lameller, særligt tydeligt membrana elastica interna, viste gul fluorescence, mens vævet ml. de elastiske lameller lyste grønt (VI, fig. 9a). De diskrete blå striber dorsalt i aorta thoracica viste orange-rød fluorescence i en smal luminal sektor af media (VI, fig. 9b).

Forsøgsdyr. I både hvidt og blå område udvikledes en betydelig neointimal hyperplasi i løbet af forsøgets første uger. Efter almindeligt skøn viste denne aftagende tykkelse i "VI" efter 60 og 180 dages overlevelse, mens den i "VII-VIII" skønsmæssigt holdt sig uforandret efter 21 dage. Pudeformede intimale fortykkelser var hyppige ml. 14 dage og 60 dage i "VI" (fig. 9e), mens neointima efter et halvt år var ensartet fortykket. I det andet forsøg "VII-VIII" var pudeformede fortykkelser til stede efter 3 uger og observeredes også i de seneste forsøg. Nekroser optrådte i media fra og med 8 dage og tiltog i udbredning i de senere forsøg ofte resulterende i aftagende tykkelse af den samlede karvæg. Efter 6 mdr. var de elastiske lameller indistinkte og uregelmæssigt anordnede (VI, fig. 9g).

Makroskopisk hvidt. (VI, fig. 9f og g). I første forsøg (VI) optrådte orangerød fluorescens af neointima og luminale zone af media indtil 30 døgn efter læsionen, hvor intensiteten af den rødlige fluorescens og dybden, hvori den trængte ind i vævet, varierede fra præparat til præparat (VI, fig. 9f). Efter 60 døgn var rødlig fluorescens i neointima sporadisk og af svag intensitet, og efter 180 døgn manglede den totalt (VI, fig. 9g). I andet forsøg (VII-VIII) var den orange-røde luminescens mindre klar, og nedsat farveoptagelse respektive totalt manglende farvning konstateredes efter 21 og 60 dage.

Makroskopisk blå (VI, fig. 9c og h). I forsøgets første uger var alle lag i karvæggen intenst rødt fluorescerende. Omkring 30 dage (VI) og 21 dage (VII-VIII) optrådte en adventitiel zone

af grøn fluorescens, og fra 60 dage (VI og VII-VIII) og til forsøgets slutning optrådte rødlig fluorescens kun i den luminale halvdel af karvæggen (VI, fig. 9h) og med tydelig nedsat intensitet, mest nedsat i "VII-VIII" (jf. p. 77).

Hvid-blå overgangszoner (VI, fig. 9d og e) var relativt skarpe, idet et tykt lag grønligt fluorescerende media fra endoteldækket område strakte sig skråt ind under intenst rødt fluorescerende media under pseudoendoteldækket område. I forsøgets første 14 dage - 3 uger gik en tynd orangerfarvet neointima under endotel jævnt over i den næsten totalt rødt fluorescerende karvæg under pseudoendotel (VI, fig. 9d). I forsøg med overlevelse 30 døgn og senere viste de hyppige pudeformede fortykkelser i endoteldækket område massiv orangerød fluorescence, som standser brat ved membrana elastica interna (VI, fig. 9e).

Transmissions-lysmikroskopi (VI) fra 19 forsøgsdyr fra forskellige hvide, blå og blandet hvide/blå områder med konventionelle kerne- og bindevævsfarvninger (VI, fig. 8) viste inflammatoriske og reparative forandringer samt nekroser som beskrevet af Helin et al. (1971a). Neointima fra hvidt område adskilte sig ikke kvalitativt fra blå område (jf. p. 74).

II. TEM korreleret med vitalfarvning (VII-VIII)

Kontrolmaterialet og præparationsmetoder (8 skinopererede dyr)

Karrene var makroskopisk normale, og der var ingen farvning med Evans blue hverken makroskopisk eller ved fluorescensmikroskopi. TEM viste endotel af typisk udseende som beskrevet af Buck (1963), Majno (1965) og French (1966). EC var lejret tæt på membrana elastica interna ved en smal zone af kondenseret trådet materiale eller adskilt fra den elastiske membran af en zone af subendotelialt væv. Heri optrådte spredte myointimale celler omgivet af

diskontinuerlige elastiske membraner (Bierring & Kobayasi 1963). Der var jævn overgang ml. de myointimale cellers MB og elastinkornene i de diskontinuerlige elastiske lameller. Mellem EC og de myointimale celler var et gitteragtigt mønster af amorf trådet substans af typen retikulær MB (rMB), som viste gradvis overgang i de trådede komponenter af elastinet i de diskontinuerlige lameller. Membrana elastica interna var amorf med en trådet komponent synlig som små pletter indlejret i den amorfe matrix. Den lumenale flade var ujævn med massive strøg af trådet materiale radierende ud i intima, medens den adventitielle flade var glat. SMC optrådte sporadisk i fenestra af membrana elastica interna og i lakuner af elastisk væv på dennes lumenale side. Media bestod af elastiske lameller adskilte af interlamellærrum, hvor SMC i varieret skrå retning forbandt lamelsystemerne parallelt med fibroelastiske bindevævsstrøg (Yamamoto 1962, Bierring & Kobayasi 1963, Seifert 1963).

TEM billederne ved de to metoder (p. 63 og 64) anvendt alternerende hos hvert forsøgsdyr gav overensstemmende oplysninger. Som helhed gav Simionescu's metode (Simionescu & Simionescu 1976a og b) baseret på LMGG's bejdningseffekt på osmierede strukturers affinitet til blysalte særdeles kraftig sværtning af amorfe komponenter i elastinet, umoden elastin, MB-substans og kollagene fibre. Evans blue accentuerede særligt i forsøgsmaterialets blå områder på ukendt måde denne sværtningseffekt, og de klareste billeder af strukturelle detaljer blev som helhed opnået med standardmetoden til TEM-præparation (p. 63).

Forsøgsmaterialet (VII-VIII)

1. Initiale læsion, inflammatoriske og reparative respons

I forsøgets første fire døgn var den lumenale flade dækket af endotelcellerester, sønderrevet bindevæv og blottede elastiske membraner. Et monolag af trombocytter, granulocytter og monocyt lignende celler adhærerede til trådet substans og devitaliseret væv. I lumenale zone af media var talrige SMC devitaliserede og

delvist autolyserede, og nogle elastiske lameller var rumperede. Omkring 4. dag var mitoser hyppige i lumenale media og i områder af overfladen dækket af umodent endotel. SMC var synlige i fene-stra af de lumenale elastiske membraner, og mesenchymale celler af forskellig type dannede et ca. 3 cellelag tykt lag inden for membrana elastica interna. En del af disse celler var lyse, organelfattige med forgrenede udløbere, andre var store mørkere celler med talrige mitochondrier, polyribosomer og uidentificerede inklusioner. Granulocytter og fagocyterende celler af makrofagtype var hyppige i karrets lumenale zone på begge sider af membrana elastica interna. Omkring 8. dag var de akutte inflammatoriske og proliferative forandringer aftaget; der var færre granulocytter og makrofager, mindre devitaliseret væv, færre mitoser, og en flere cellelag tykt neointima var dannet lumenalt for membrana elastica interna med optræden af secernerende myointimale celler af typen modificerede SMC. Endotel eller pseudoendotel var under udvikling på overfladen.

2. Reendotelialisering, vitalfarvning og subendotelialt bindevæv
I forsøgets første døgn var aortavæggen totalt blå med orangerød fluorescens af hele karvæggen. Devitaliserede endotelceller var til stede enkeltvis over hele fladen eller i grupper omkring ica. De var svulne med udvisket organelstruktur og store vakuoler i cytoplasmaet, og forbindelsen til naboceller var afbrudt. Fjerde døgn optrådte omkring ica sammenhængende lag af ungt udseende EC repræsenteret af små hvide øer, som viste orangerød fluorescens i ca. 2/3 af media's tykkelse. Mitochondrier, polyribosomer og dilateret RER var fremtrædende, mens Golgikomplekser og indholdet af mikropinocytosevesikler var lidet fremtrædende (VII, fig. 2b). Cellekontakterne var smalle og ukomplette (VII, fig. 2a og b). I marginale EC på grænsen til ikke endoteldækket flade var ruffles og makropinocytosevesikler fremtrædende, og 60 Å mikrofilamenter var hobevis kondenseret i ruffles og i cellens abluminal afsnit (VII, fig. 2b og 5). Subendotelialt var de ovenfor omtalte mesenchymale celler omgivet af en svagt kondenseret amorf og trådet substans (VII, fig. 2a, VIII, fig. 1).

Mellem 8 og 21 dage (VII, fig. 3, VIII, fig. 2) var Evans blue hvide øer omkring ica konfluerede, og efter 21 dage var rødlig fluorescens kun antydnet i lumenale 1/3 af media (VII-VIII). Tæt ved ica interdigiterede cellekontakterne, marginale flaps var fremtrædende og junctions af 5-laget type var hyppige (VII, fig. 3b og c). Mikrofilamenter 100 Å og 60 Å var tiltaget i mængde med pletvis kondensation af 60 Å mikrofilamenterne tæt ved den abluminal plasmamembran (VII, fig. 3b). I 21 dages perioden var dilateret RER og Golgikomplekser, talrige mitochondrier og Palade bodies (jf. Weibel & Palade 1964), såvel som mikropinocytose vesikler fremtrædende. De basale caveoli udtømte eller opsamlede en amorf kornet substans, som indgik i den gitteragtige rMB, der var beliggende mellem EC og elastinkorn omgivende myointimale celler (VII, fig. 3d). Den retikulære MB bestod af fintrådet materiale og amorf substans, hvori stellate figurer af udseende som glykosaminoglykaner (GAG) indgik (VIII, fig. 2d). I dybden i retning mod de myointimale celler optrådte stedse mere fortættede klumper af amorf materiale, tilblandet trådet substans, som gradvis smeltede sammen med elastinkorn omkring de myointimale celler. En lignende amorf trådet substans i kontinuitet med myointimale cellers MB dannede et regulært lag ml. disse celler og elastinkorn i den subendoteliale zone (jf. VIII, fig. 3e). Elastinkornene indgik her i diskontinuerlige bølgeformede elastiske lameller omgivende myointimale celler i den subendoteliale zone. Elastinkorn var uens store, bestod af en kerne af amorf substans og en kappe af trådet substans, som etablerede kontinuitet med andre elastinkorn i lamellerne, med MB-lignende substans i kontinuitet med SMC's MB og med den rMB, som var i kontinuitet med indholdet i endotelcellernes basale caveoli. Strukturen af subendotelialt bindevæv i neointima lignede subendotelialt bindevæv i normale kar (se ovenfor p. 69). De myointimale celler i både 8 dages og 21 dages forsøget var sekretorisk aktive, men de fleste kunne identificeres som SMC på MB, myofilamenter, dense bodies og mikrovesikler.

Imellem ica varierede differentieringen af EC og subendotelialt væv i overensstemmelse med beskrivelsen ovenfor af neointima

4. dag og 8.-21. dag.

Efter 60 og 240 døgns overlevelse (VII, fig. 4, VIII, fig. 3) var næsten hele intima dækket med endotel og impermeabelt for Evans blue uden spor af rød fluorescens.

Tæt ved ica frembød EC prominente marginale folder, 5-lagede junctions, aggregater af basale mikrofilamenter og Weibel Palade bodies, og det subendoteliale væv var kondenseret (VII, fig. 4a). I nogle tilfælde så EC modne ud og dækkede subendotelialt væv med moden elastin (VII, fig. 4b, VIII, fig. 3b).

Mellem ica varierede differentieringen af EC og subendotelialt væv. Marginale EC overvoksede pseudoendotel var uforandrede. (VIII, fig. 3d).

I grænsezoner mellem endotel og pseudoendotel overlejlrede marginale EC pseudoendotelceller uden interposition af bindevævssubstans. Marginale EC var af umodent udseende og præsenterede ruffles, makropinocytosevesikler og hobede 60 Å mikrofilamenter og var uforandrede i alle forsøgets faser (VII, fig. 2b og fig. 5).

Blåfarvede områder var i forsøgets første fire døgn dækket af thrombocyttter og blodceller adhærente til denuderede flader. Efter 8 døgn var pseudoendotel (VII, fig. 6) til stede, og efter 21 døgn dominerede dette blå område uden apposition af blodelementer. Pseudoendotelet var modificerede SMC med abluminalt orienteret kerne og en kompakt luminal zone af tæt pakke mikrofilamenter (VII, fig. 6, VIII, fig. 2c og e, VIII, fig. 3c og f).

Cellernes randpartier dannede forgrenede cytoplasmatiske udløbere, der lignede ruffles, som ikke dannede regelmæssig kontakt, men efterlod åbentstående forbindelser til det underliggende væv (VII, fig. 6, VIII, fig. 2c og VIII, fig. 3f). Cellernes sekretoriske udrustning og antallet af mikrovessikler var beskedent (VIII, fig. 2e). Dens bodies var antydnet i den luminal zone med tæt-pakke mikrofilamenter, men ellers ikke til stede. Bindevævet

under pseudoendotelet bestod i en sparsom trådet substans, hvori få tilfældigt lejrede elastinkorn var spredt (VII, fig. 6, VIII, fig. 2c). Myointimale celler af typen modificerede SMC lå tilfældigt lejret tæt ved pseudoendotelet og sendte tit udløbere op til overfladen mellem pseudoendotelcellernes forgrenede udløbere (VIII, fig. 3f, jf. p. 35 og 40). Pseudoendotelet blev fortrængt ved overvækst af genuint endotel, og 60-240 døgn efter læsionen persisterede kun små øer af blåt. De viste orange-rød fluorescence ca. 1/3 i dybden af media og sml. med 21 dages forsøget var intensiteten af den rødlige fluorescens aftaget. De åbne kommunikationer ml. pseudoendotelcellernes forgrenede udløbere var uforandret, og indholdet af kollagen i neointima var øget (VIII, fig. 3f).

3. Reendotelialisering, struktur og organisering af det dybere neointimale bindevæv

A. Forskelle i bindevævs kvalitet

Omkring 8-21 dag efter afløbet af de akutte inflammatoriske og reparative processer var der udviklet en flere celledag tyk neointima samtidig med at betydelige områder af intima var blevet dækket med endotel. Der var modsat observationerne med transmissions lysmikroskopi (p. 69) en betydelig kvalitativ forskel på neointimalt bindevæv dækket af endotel respektive af pseudoendotel. Ud over forskellene i subendotelialt bindevæv beskrevet ovenfor var neointima's dybere lag i endoteldækket område lamineret bindevæv rigt på elastin (VIII, fig. 2a, fig. 3b), mens ikke-endoteldækket neointima var desorganiseret med forstyrret elastogenese og tendens til fibrose (VIII, fig. 2c, fig. 3c).

Det laminerede bindevæv i endoteldækket neointima bestod i alternerende lag af sekretorisk aktive SMC og intercellulær substans af varierende tæthed. SMC var omgivet af en diskontinuerlig MB, og der var en tendens til spacing: MB nærmest SMC, dernæst amorft

trådet substans i kontinuitet med små elastiske fibre, og fjernet fra SMC kollagene fibre (VIII, fig. 3e).

Under pseudoendotel var anordningen af celler og bindevæv tilfældig (VIII, fig. 2c, fig. 3c). I en zone nærmest lumen var SMC tilfældigt lejret ofte med udløbere indkorporeret i overfladen, og bindevævet var svagt kondenseret (VII, fig. 6, VIII, fig. 2c og e, fig. 3c). I de dybere lag var grove klumper af elastin, kollagene fibre og SMC tilfældigt blandet, og delaminering af membrana elastica interna var hyppig.

I 8-21 dages forsøget var endoteldækket neointimas dybere lag regelmæssigt lamineret og kondenseret i biopsier udtaget tæt ved ica (VIII, fig. 2a), mens laminering og kondensering af bindevæv varierede i biopsier udtaget mellem ica. Tæt ved grænsezoner ml. endotel og pseudoendotel var SMC og elastiske bindevævs-komponenter mindre regelmæssigt orienteret (VIII, fig. 2b).

I forsøgene med 60-240 dages overlevelse gjorde samme fordeling m.h.t. bindevægets laminering og kondensering sig gældende: tæt ved ica var organiseringen regelmæssig (VIII, fig. 3b), ml. ica varierede den og i grænsezoner var bindevævet løsere og anordningen af dets komponenter mindre regelmæssig (VIII, fig. 3a og d). I neointima dækket af pseudoendotel (VIII, fig. 3c og f) var indholdet af kollagene fibre betydeligt øget. Luminalt var det elastiske væv ofte distorseret af kollagen, mens de grove kantede elastinbrokker i de dybere lag tenderede til at være arrangeret i et lamineret mønster. Sammenkædningen af de elastiske korn til lameller og/eller fibre var imidlertid defekt (VIII, fig. 2c, fig. 3c og f) sammenlignet med forholdene i neointima dækket af endotel, hvor elastinkorn synes at blive samlet til større komponenter under medvirken af elastinets mikrofibriller (VII, fig. 3a, fig. 4a og b, VIII, fig. 3e).

B. Semikvantitering af forskelle i bindevævs kvalitet. Forekomsten af lamelleret og ikke lamelleret bindevæv registreres i vævsblokke ekscideret tæt ved ica, mellem ica og fra grænsezoner mellem Evans blue hvid/blå områder (VIII, tabel 1) fra overlevelsesperioderne 8-240 dage.

Tæt ved ica (30 blokke, hvoraf 28 kunne bedømmes) dominerede EC, og bindevævet var overvejende lamelleret. Mellem ica (16 blokke) var forekomsten af EC og pseudoendotel ligeligt fordelt, og forekomsten af endotel koinciderede mest med forekomsten af lamelleret bindevæv, mens bindevæv under pseudoendotel var ulamelleret. I vævsblokke ekscideret fra makroskopisk hvide-blå overgange (7 blokke) manglede korrelansen ml. EC/lamineret bindevæv og pseudoendotel/ikke lamelleret bindevæv.

DISKUSSION

Lysmikroskopistudier korreleret med vitalfarvning (VI)

Den anvendte metode til vitalfarvning er analog med metoden anvendt af McGill et al. (1957), Packham et al. (1967), Björkerud & Bondjers (1971a), Somer & Schwartz (1971 og 1972), Somer et al. (1972), Bell et al. (1972), Caplan & Schwartz (1973), Bell et al. (1974), Caplan et al. (1974), Somer et al. (1974), Stemerman et al. (1977), Gerrity et al. (1977), Clowes et al. (1978). Observationerne på metodestudier (VI) tyder på, at det farvende agens i vore forsøg har været Evans blue proteinkompleks, jf. Packham et al. (1967), som refererede lokal blåfarvning til lokal akkumulation af både albumin og Evans blue i aortavæggen.

Farvens indtrængen i aortavæggen er mulig ad to veje, fra blodstrømmen gn. intima og via vasa vasorum fra den adventitielle side (Heck et al. 1976). Tilstedeværelsen af orangerød fluorescens tages som mål for farvens penetration i karvæggen (Steinwall & Klatzo 1966). I nærværende forsøg blev kun den intimale rute for farvens passage registreret, idet adventitia var fjernet ved skarp dissektion, og i det hele taget indtrængen af farve

fra adventitia syntes minimal. Forskellen i luminescens ved fluorescens mikroskopi i de to forsøg (VI, VII-VIII, p. 68) skyldes formentlig forskelligt fiksativ. Buffet formalin i første forsøg (VI) gav smukkere og klarere billeder end fluorescens mikroskopi i andet forsøg (VII-VIII), hvor Karnovsky's fiksativ var anvendt.

Kombinationen af vitalfarvning og sølvfarvning viste, at ekspansionen af makroskopisk hvidt skyldtes reendotelialisering, mens makroskopisk blånt enten var denuderet flade eller intima dækket af pseudoendotel. Observationerne ved planimetri bekræftede tidligere observationer m.h.t. hastigheden af reendotelialisering, først hurtigt, siden langsomt. Overfladelysmikroskopi efter sølvfarvning fremstillede de samme sølvlinjemønstre som i tidl. forsøg (I, II, III, IV, V) og indicerede, at nyt endotel dannes fra i forvejen eksisterende endotel (jr. p. 38). Häutchenpræparater med kombineret sølvfarvning og kernefarvning viste samme træk som i Florey et al.'s forsøg (1959) og bekræftede Poole et al.'s (1958) observation af proliferativ aktivitet i ekspanderende endotels randzoner (jf. p. 34). Påfaldende var den sjældne forekomst af umiskendelige mitosefigurer sammenlignet med TEM. Andre tegn til proliferation var dog til stede, endoteliale kæmpeceller, anisocytose, polychromasi og uordentlig orientering af endotelcellernes kerner. Disse forandringer var særligt udtalte på endotelsiden af randzoner mellem endoteldækket og ikke endoteldækket flade. Vigtigste observation ved kombineret vitalfarvning, penetrationsstudier og overflademikroskopi var, at permeabiliteten af en helende aorta aftager, og at EC's tilstedeværelse er en forudsætning for reetablering af en intimal barrier. Den nydannede intimale barriere er ifølge oplysningerne ved fluorescensmikroskopi først inkomplet, men bliver med tiden perfekt.

De foreliggende observationer gav ingen anatomisk forklaring herpå, men forskellige positive korreleranser kunne udledes vedrørende EC's rolle i intima's permeabilitet. Nydannede EC i forsøg med kort overlevelse var generelt permeable, i forsøg med lang overlevelse var EC generelt impermeable. EC i randzoner var permeable

forsøget igennem, og samme steder viste EC tegn til proliferativ aktivitet, og i neointima var pudeformede fortykkelser hyppige. Undersøgelserne afslørede ingen direkte sammenhæng mellem ungt og/eller prolifererende endotel og øget permeabilitet eller forklarede den tidsskorrelerede reetablering af den intime barriere. Den sjældent observerede koincidens af stomata og svagt farvet hexagonalt endotel forblev uopklaret, idet stomata's betydning er uklar (Björkerud et al. 1972, Caplan et al. 1974).

Passagevejen for Evans blue proteinkompleks gennem endotelet forblev uoplyst (p. 59). Negativ korrelans til EC's rolle i permeabiliteten foreligger, hvor EC mangler, og fladen er denuderet eller dækket af pseudoendotel. Her er intima makroskopisk blå i hele forsøgsperioden, men fluorescensmikroskopi viser tidsskorreleret aftagende penetrabilitet for Evans blue protein kompleks. Forudsættes den intime barriere, repræsenteret af denuderet flade eller pseudoendotel at være neglignabel forsøgsperioden igennem, kan den aftagende penetrabilitet i blå område henføres til ændringer i bindevæv, som Helin et al. (1971a) og Helin (1977) sætter i forbindelse med aftagende permeabilitet.

Konklusion: EC er afgørende for reetablering af barrierefunktionen i en helende aorta, men barrierens perfektion hænger sammen med ikke erkendte ændringer i EC og/eller bindevæv. Indicier peger på, at EC's alder og proliferative aktivitet er af betydning for deres rolle i barrierefunktionen. Tidsskorrelerende ændringer nedsætter permeabiliteten af bindevæv uafhængigt tilstedeværelsen af EC i vedvarende permeable områder dækket af pseudoendotel.

TEM korreleret med vitalfarvning (VII-VIII)

Fejlkilder og metodernes begrænsning

Excision af vævsblokke fra korresponderende horisontale niveauer er ikke konsekvent gennemført i forsøgets forskellige tidsfaser (se VII, fig. 1). Aorta's caudale segment vil blive udsat for et sværere mekanisk traume af den opblåste ballon end de cephaliske afsnit p.g.a. snævrere lumen, tyndere væg og ekstensiv fiksatoren til diafragma. Forskelle mellem aorta's cephaliske og caudale af-

snit kunne forventes i retning af forskellig hurtighed, sekvenser og kvaliteter af helingsprocesserne. Ekspansion af makroskopisk hvidt efter vitalfarvning med Evans blue foregår i forsøgets første uger hurtigere i cephal halvdel, men derudover er ingen forskelle konstateret med de andre undersøgelsesmetoder. Forskelle i ultrastrukturen er ikke observeret i præparater excideret fra cephal og caudale afsnit, og variationerne i ultrastruktur var ensartede i forskellige horisontale niveauer i alle forsøgets faser. Vævsblokke excideret tæt ved ica. indeholdt sandsynligvis EC dannet i den reparative fases første døgn, mens væv excideret mellem ica kunne indeholde EC dannet dage, uger eller måneder efter læsionen i overensstemmelse med det irregulære og varierede mønster af reendotelialisering (VI, p. 65). I grænsezoner mellem endotel og pseudoendotel var reendotelialisering processen igangværende i alle forsøgets faser.

Initiale inflammatoriske og reparative respons

Ballonlæsionen medførte et subtotalt traume af intima og lumenale media. Thrombocytter og blodceller dannede et diskontinuerligt monolag på denuderet flade, men inkorporering af thrombocytter i de dybere lag blev modsat Stemerma & Ross (1972) ikke observeret. Undersøgelser bekræftede mange træk i andre forfatteres indgående beskrivelse af den mekaniske arterielæsions initiale faser herunder mitoser i EC og SMC, og disses vandring, dedifferentiering og repopulering af neointima efterfulgt af redifferentiering. Men studiet bragte intet nyt til diskussionen om blodbårne cellers mulige bidrag til reparation af endotel og SMC (jf. p. 55 og 56).

Endotelcellers og subendotelialt bindevævs rolle i heling og permeabilitet

I perioden 8-21 døgn efter læsionen indtræffer samtidige markante ændringer i EC, subendotelialt bindevæv og intimas permeabilitet. Den intimal barriere etableres i denne periode og bliver nogle uger senere perfekt.

EC ændres m.h.t. organeludrustning og kontakt med naboceller.

De første døgn er sekretorisk udrustning og mikrovesikler sparsomme og cellekontakter inkomplette. Efter 8-21 døgn og fortsat de følgende uger er sekretorisk udrustning og endocytoseaktivitet iøjnefaldende, og cell contacts brede med differentierede junctions. I randzoner af ekspanderende endotel forbliver EC uforandrede i hele forsøgsperioden, sekretorisk inaktive med inkomplette cell contacts og har en organeludrustning (hobede 60Å filamenter, ruffles og makropinocytosevesikler), der tyder på migration.

Det subendoteliale bindevæv er initialt svagt kondenseret, men bliver i 8-21 dages forsøget præget af rMB, secernerende SMC og elastogenese og bærer på én gang præget af at være umodent og organiseret.

Forholdet mellem modning af den intimale barriere og ovennævnte ændringer i EC og bindevæv er koincidens, passagevejen for Evans blue proteinkomplex forblev ukendt, og undersøgelser med TEM (VII-VIII) gav ingen direkte forklaring på reetableringen af den intimale barriere.

Arbejdet baseret på studie af intima's overflade (VI) beviste EC's afgørende betydning for barrierefunktionen og tydede på, at EC's alder og proliferative aktivitet begge havde betydning (jf. p. 78). Studiet baseret på TEM (VII-VIII) indicerede, at både EC og bindevæv har betydning i barrierefunktionen.

En fælles nævner for EC's rolle i barrierefunktionen må efter foreliggende dokumentationer i begge studier (VI, VII-VIII) søges i egenskaber, som er fælles for unge EC og prolifererende EC. Mest iøjnefaldende var inkomplette cellekontakter, som var typiske for EC i forsøgets første døgn og i hele forsøgsperioden for EC i randzoner. Etablering af brede cellekontakter og/eller differentiering af cell junctions var koincident med reetablering af barrierefunktionen og kan være én af faktorerne, som er årsag til perfektionen af den intimale barriere.

Andre forff.s observationer har ikke givet klar besked på, i hvilket omfang EC's cellekontakter kunne spille en rolle for reetablering af den intime barriere efter endotelbeskadigelse. Orientering og lejring af EC spiller en rolle. Gottlob & Zinner (1962) bemærker, at den øgede permeabilitet efter ligaturtraume reduceres væsentligt på det tidspunkt, da sølvlinjemønsteret i det helende endotel bliver normalt. Ifølge Hirsch & Robertson (1977) bliver nydannet endotel impermeabelt i den postconfluente fase, og Webster et al. (1974b) beskriver aftagende permeabilitet efter reorientering af EC's cellemønstre, muligvis under indflydelse af hemodynamiske påvirkninger. Reorientering af EC under helingen kan have betydning for differentieringen af cellekontakter og skal muligvis, hvis hemodynamiske påvirkninger betinger cellemønsterets orientering, finde sted, før betingelserne er til stede for differentiering af cellekontakter. Illustrationer i Webster et al.'s (1974a og b), Stemerman et al.'s (1977) og Clowes et al.'s (1978) arbejder viser, at brede cell contacts med cell junctions etableres i.l.a. helingsperioden, og ifølge Webster et al. (1974b) var permeabiliteten for det store ferritinmolekyle øget i 3 uger, mens permeabiliteten for det mindre HRP-molekyle endnu persisterede efter 27 uger. Cell contacts' rolle i permeabiliteten fremgår imidlertid mest indirekte ved sammenligning med det massivt permeable pseudoendotel med åbne spalter mellem cell contacts (Stemerman et al. 1977, Clowes et al. 1978). Stemerman et al. (1977) beskriver interdigiterede cellekontakter og gap-junctions i makroskopisk hvidt område, men erkender kun ændret permeabilitet som farvning i blå områder dækket af modificerede SMC (pseudoendotel), mens Clowes et al. (1978) påviser aftagende permeabilitet for nydannet endotel i løbet af forsøgsperioden fraset EC i randzonerne, som vedvarende er permeable. Samme forff. (Clowes et al. 1978) viser etablering af brede cellekontakter med flaps mellem EC til forskel fra pseudoendotel, men specificerer ikke cellekontakters rolle i reetableringen af den intime barriere.

I nærværende arbejde (VII-VIII) tillod TEM præparationsmetoderne ikke differentiering mellem tight junctions og gap-junctions

(Hüttner et al. 1973). De 5-lagede cell junctions observeret fra og med 8-21 dages perioden kunne derfor ikke nøjere klassificeres. Schwartz et al. (1975) beskriver under heling af ballonlæsion tidsskorreleret differentiering af kontakten ml. EC med tidlig optræden af "spot-like regions of contact" og senere udvikling af "extensive regions of membrane apposition". Ifølge forff. og Schwartz & Benditt (1972b) er disse kontaktregioner snævre nok til at blokere passagen for albuminmolekylet. Områder af læderet intima, som sidst reendotelialiseres, vil i længst tid præsentere EC med kun "spot-like cell contacts". Schwartz et al. (1975) foretager ikke analyser af permeabiliteten, men forventer at områder dækket af SMC vil vise forøget permeabilitet, så længe de ikke er reendotelialiserede, idet SMC ikke er i stand til at differentiere cell junctions.

Egne observationer sammenholdt med citerede forff.'s studier gør sandsynligt, at etablering af cellekontakter og differentiering af junctions spiller en rolle i perfektionen af den intime barriere, som har reendotelialisering som forudsætning.

Det neointimale bindevævs betydning for barrierefunktionen fremgik direkte af egne observationer på ét punkt: permeabiliteten af neointima dækket med pseudoendotel aftager i forsøgets sene faser. Forudsættes pseudoendotelet overensstemmende med uændret morfologi (p. 74 og 78) at være uændret stærkt permeabelt, kan den nedsatte permeabilitet sættes i forbindelse med den iagttagne kondensering af bindevævs matrix med øget mængde elastin, kollagen og lamellering af dybere lag i de sene forsøg (p. 75). Den øvrige information om bindevævs betydning for permeabiliteten var indirekte, i.e. koincidens af aftagende permeabilitet og ændringer i EC og bindevævet (p. 80). Den vedvarende massivt øgede permeabilitet under pseudoendotel viser negativt, at uden EC på overfladen er bindevævsdannelsen mangelfuld og barrierefunktionen defekt.

Observationer af Clowes et al. (1978) støtter hypotesen, at det subendoteliale bindevæv spiller en rolle for barrierefunktionen.

Traceren (HRP) blev standset umiddelbart under det permeable nydannede endotel. Modsat passerede traceren videre i dybden, hvor neointima var dækket af pseudoendotel. Observationen tyder på, at bindevævet under genuint endotel har barriereegenskaber, som bindevævet under pseudoendotel mangler. Klynstra & Böttcher (1970) sandsynliggjorde, at GAG er integreret i den intime barriere. Wight & Ross (1975) studerer bindevævsmatrix i den helende neointima og påviser, at proteoglykaner tilknyttet GAG tjener til at knytte bindevævs elementer sammen. Wight & Ross (1975) og Helin (1977) tillægger makromolekylers metabolisme og organisering som et ladet filter betydning for permeabiliteten af den helende karvæg.

I egne forsøg syntes EC at have betydning for det subendoteliale bindevævs sammensætning og organisering. EC og underliggende SMC viste tegn på intens metabolisk aktivitet. Indholdet af amorf kornet substans i EC's basale caveolae var i kontinuitet med rMB's amorf trådede substans, som indeholdt stellate figurer, formentlig GAG og proteoglykaner (Kadar et al. 1972). Dybere i vævet tæt ved SMC var muraliet af matrixkomponenter tættere og indeholdt korn med amorf kerne og trådet overflade af typen elastin units (Pease & Paule 1960, Yamamoto 1962, Haust et al. 1965, Haust & More 1967). De elastiske korn omkring SMC syntes at blive knyttet sammen ved disse korns perifere trådede substans til kornede elastiske lameller (p. 72 og 75). Mellem disse lameller og SMC var en "modningsgradient" hyppig: SMC, MB og elastin. Lignende billeder af elastogenese præsenteres af Yamamoto (1962), Kadar et al. (1969, 1971 og 1972), Wight & Ross (1975), Katsuda & Kajikawa (1977).

Modsat ses under pseudoendotel en sparsom lidet kondenseret bindevævsmatrix, og SMC og elastinkorn ligger tilfældigt, tilsyneladende uden effektiv sammenknytning af elastiske korn ofte med et betydeligt islæt af kollagene fibre (p. 75). SMC's lejring er tilfældig og deres evne til dannelse af lødigt organiseret bindevæv er tilsyneladende kompromitteret.

Endotelets tilstedeværelse i neointima har betydning for den sub-endoteliale zones indhold af rMB, GAG og elastin og for disse komponenters organisering.

Virkningsmekanismen er ikke klarlagt. En integreret metabolisk aktivitet ml. SMC og endotel af betydning for sekretion af nævnte matrixkomponenter er en mulig forklaring på de observerede forskelle i subendotelialt bindevæv. EC har formentlig sekretorisk aktivitet. Ifølge Vracko & Benditt (1970) danner kapillært endotel MB, og rMB i aortas subendoteliale bindevæv hos den voksende rotte secerner sandsynligst af EC (Schwartz & Benditt 1972a). Pease og Molinari's (1960) studie af kar af forskellig størrelse peger på MB og elastin som integrerede byggestene samordnet på forskelligt organisationsniveau afhængige af karrets størrelse. Forff. antyder, at SMC (og måske endotel) var i stand til at organisere det arterielle vævs bindevævsskelet. Det er uvist, hvorvidt EC kan danne sulfonerede mucopolysaccharider; Curran (1957) og Moore & Schoenberg (1959) finder støtte for hypotesen, mens Stehbens (1962) er meget skeptisk.

Koincidensen af EC's tilstedeværelse med intakt barrierefunktion og velorganiseret "løddigt" subendotelialt bindevæv med barrierefiltre-udseende kan skyldes, at EC spiller en dobbelt rolle. En rolle som integreret del af den intime barriere, en anden rolle som determinator i den subendoteliale dannelse af et bindevævs-matrix filter for makromolekyler under "styret" medvirken af SMC.

Reendotelialisering og lamellering af det neointimale bindevæv
(se VIII - table 1).

Helin et al. (1971a og b) og Helin (1977) har ved morfologiske og histokemiske studier vist, at ballonlæsionen efterfølges af uspecifikke bindevævsreaktioner af typen "injury and repair", velkendte fra granulationsvæv andre steder i organismen. Nærværende studie (VII-VIII) har vist, at forløbet af disse reparative processer påvirkes af EC's tilstedeværelse. Ekspansionen af endotel hen over en flade dækket af pseudoendotel medfører organisering, lamellering og kontrolleret elastogenese.

Koincidensen af EC og lamelleret myoelastisk væv kunne bero på tilfældig optræden samtidig af to indbyrdes uafhængigt forløbende processer, reendotelialisering og organisering af bindevævet. Organiseringen af bindevævet kunne endog være den primære begivenhed, som var direkte afhængig af traumets sværhed (Björkerud 1969, Björkerud & Bondjers 1971a og b), mens reendotelialiseringen var sekundær og i sit forløb afhængig af forløbet af de reparative processer i bindevævet.

Observationerne i nærværende studie (VII-VIII) begunstiger tesen, at endotelets tilstedeværelse igangsætter de mekanismer, som fører til organisering af det neointimale bindevæv. Bindevævet lamellering er positivt korreleret til reendotelialiseringens "alder". Ved ica, hvor reendotelialisering tidligst sætter ind, er bdv. regelmæssigt lamelleret, ved grænsezoner, hvor reendotelialisering er igangværende, er koincidensen af EC og lamelleret bdv. kun svagt antydnet, og i ikke reendotelialiserede områder fraset grænsezoner, er bdv. desorganiseret. Hvis reendotelialiseringen var sekundær til rekonstruktionen af organiseret bdv., ville ekspansionen af endotel næppe, som tilfældet er, følge et mønster, der starter som isolerede øer omkring ica, herefter konfluerer og fortsat ekspanderer i kontinuitet med i forvejen eksisterende endotel. Korrelanser mellem bindevævet lamellering og reendotelialiseringens "alder" og dens koincidens med fronterne af ekspanderende endotel gør det usandsynligt, at bindevævet organisering er den primære begivenhed, og at reendotelialiseringen kunne være sekundær dertil.

Den intimale barriere og organisering af det neointimale bindevæv
Reendotelialiseringens betydning for forløbet af de reparative processer i det neointimale bindevæv kan alene bero på reetablering af barrierefunktionen, i.e. eksklusion fra blodstrømmen af stoffer, som virker stimulerende/og eller forstyrrende på bindevævsdannelsen. I følge Ross & Glomset (1973) er forstyrrelse af den intimale barrieres integritet afgørende for igangsættelse af SMC's proliferative respons, og EC's betydning for forløbet af de reparative processer beror på EC's barrierefunktion. I

nærværende studie (VII-VIII) kan sammenhængen ml. reendotelialisering og lamellering af det neointimale bindevæv alene bero på reetablering af den intime barriere. En manglende intimal barrieres konsekvens for helingsprocesserne fremgår tydeligt af bindevævsstruktur i neointima dækket af pseudoendotel. Her er bindevævsdannelsen stærkest kompromitteret i zonen tættest ved lumen, men mere intakt i de dybere lag (p. 75). I områder af kortvarig reetablering af den intime barriere i overgangszoner mellem endotel og pseudoendotel er bdv. præget af en vis grad af organisering og lamellering, men i betydeligt mindre grad end bdv. i områder med "højere alder" af reendotelialisering tæt ved ica. Den intime barrieres betydning for bdv.'s reaktion synes at slå igennem, når reendotelialiseringen har været en vis tid. Barrierens betydning for bdv. i neointima's dybere lag kan bero på, at SMC uforstyrret af indtrængen af plasmakomponenter kan adaptere et vækstmønster af typen alternerende lag af SMC og elastinholdigt bdv. som det kendes fra in vitro forsøg (Ross 1971, Moskalewski et al. 1976, Buck 1977, Hinek & Thyberg 1977). Denne adaptation varer formentlig nogen tid, hvilket kan forklare, at blandede typer af neointima observeres i overgangszoner ml. endotel og pseudoendotel.

Ultrastrukturelle forskelle mellem neointima dækket af endotel og pseudoendotel

Sammensætningen af bdv. matrix og anordningen af SMC og matrixkomponenter varierede. I endoteldækket neointima var konstellationen af SMC, MB, MB-lignende substans og elastin som typisk er i arterielt væv (Pease & Paule 1960, Karrer & Cox 1961, Yamamoto 1962, Haust 1965, Haust & More 1967, Kadar et al. 1969, Katsuda & Kajikawa 1977). Matrixkomponenternes rumlige fordeling i vore forsøg kan tolkes som en "sekvens i elastogenesen" efter Katsuda & Kajikawa (1977): "elastinkornene smelter sammen og vokser til større korn, disse igen forenes til større elastiske aggregater under medvirken af mikrofibriller". I den subendoteliale zone dannes herved kornede elastiske lameller (p. 72). I de dybere lag af neointima opstår alternerende lag af SMC og amorf trådet bdv. matrix indeholdende elastin af varierende

modningsgrad. Organiseringen af dette lamellerede myoelastiske væv minder om voksende dyrs aortavæv (Cliff 1967, Schwartz & Benditt 1972a, Gerrity & Cliff 1975, Gerrity et al. 1975) og om vævet i Björkerud & Bondjers (1971b) "regressive lesion". Strukturen af endoteldækket neointima gennemløber i l.a. forsøgsperioden de samme differentieringsfaser, som den voksende rotte-aorta i de første 3 uger (Cliff 1967), før den fase indtræder, hvor SMC i den voksende aorta reorienteres i skrå retning mellem de elastiske lameller. Forløbet af helingsprocesserne i endoteldækket neointima ligner de processer, som formgiver karret og i den intakte organisme vedligeholder vævets arkitektur som lamelleret myoelastisk væv. Haust (1971) karakteriserer karvæggens reparative response: " This is no doubt an attempt to mimic the original structure in order to preserve functional integrity." I en længere forsøgsperiode kondenseres og modnes det elastiske væv og indholdet af kollagene fibre øges, men arvæv med distorsion af vævets lamellerede struktur ses ikke.

Ultrastrukturen af ikke endoteldækket neointima ligner "non regressive lesion" beskrevet af Knieriem et al. (1973) efter dybtgående mekanisk læsion med retarderet reendotelialisering. I nærværende studie (VII-VIII) manglede bindevævet i neointimas lumenale zone netværket af rMB (p. 74) og i de dybere lag er sekvensen af SMC, MB-subst. og elastiske komponenter mindre regelmæssig ofte afbrudt af kollagene fibre lejret tæt på SMC. Lejrningen af SMC og grove elastinkorn er tilfældig. Forskellen til neointima dækket af endotel synes at bero på et svigt i elastogenesen i forbindelse med sekretion af elastinets forstadier og i sammenkædning af de elastiske korn til større korn under medvirken af mikrofibriller (se ovenfor p. 86, citat af Katsuda & Kajikawa 1977). Et lignende svigt i elastogenesen nævnes af Poole & al. (1971) i studiet af heling af suturimplantation. Forff. bemærkede, at der var dissociering af den tætte relation mellem mikrofibriller og elastin og lod muligheden åben, at "what was observed represents a failure of whatever mechanism it is that normally brings about the association of microfibrils with elastic structures."

I forsøg med lang overlevelse er kollagene fibre fremtrædende og maskerer flere steder tendensen til lamellering af SMC og elastin i neointimas dybere lag.

De reparative processer i neointima udvikler sig forskelligt afhængigt af EC's tilstedeværelse. Når EC er til stede, får helingsprocesserne et forløb, der i Gillman's terminologi kunne betegnes "reconstructive", "remodelling" (Gillman & Hathorn 1957). Det reparative mønster i endoteldækket område havde træk fælles med normalt arterievæv (Pease & Molinari 1960, Yamamoto 1962, Bierring & Kobayashi 1963, Seifert 1963, Buck 1963, Majno 1965, French 1966, Katsuda & Kajikawa 1977), voksende dyrs aorta (Schwartz & Benditt 1972a, Cliff 1967, Gerrity & Cliff 1975, Gerrity et al. 1975), med hyperplastiske ændringer udløst af etablering af kollateralt kredsløb (Schaper et al. 1972) og hemodynamisk stress (Imparato et al. 1974) og med spontane intimale fortykkelser i coronarkar og aorta (French et al. 1963 og 1965, Hartman 1977, Rapola & Pesonen 1977), samt med pseudointima i indhelede Dacron grafts (Florey et al. 1961 og 1962).

Uden endotelets tilstedeværelse får de reparative processer et andet forløb, og slutresultatet minder om arvæv. I Gillman's terminologi ville klassificeringen hyppigt stemme overens med terminologien "non reconstructive" og "repair" førende til arddannelse (Gillman & Hathorn 1957).

Resultaterne i nærværende studier (VII-VIII) indicerer, at et samspil mellem EC og SMC er ansvarligt for oprettelsen af en intimal barriere såvel som af betydning for forløbet af helingsprocesserne efter et mønster, der ligner "remodelling" og "reconstruction" af arterielt vævs grundstruktur. Det er muligt, at LETS protein (Gospodarowicz et al. 1978) også kaldet fibronectin (Mosher & Vaheri 1978, Singer 1979), som dannes i store mængder af vaskulært endotel, foruden at have betydning for tilhæftning af EC også spiller en rolle for organiseringen af det neointimale bdv.

Proliferation af SMC som følge af EC beskadigelse er nøglebe-

givenheder i atherogenesen (Ross & Glomset 1973 og 1974). Nærværende studie (VII-VIII) indicerer, at EC ud over at være integreret i barrierefunktionen spiller en rolle for forløbet af karvæggens reparative processer, muligvis gennem et funktionelt samspil med SMC.

Konklusion og tese

Nærværende studier (VI, VII-VIII) har dokumenteret:

I. EC er afgørende for reetableringen af barrieren i den helende aorta.

II. Nydannet endotel er delvis permeabelt og bliver med tiden impermeabelt.

III. Bindevævet i neointima er forskelligt sammensat og organiseret under endoteldækket og ikke endoteldækket overflade.

IV. Der foreligger tidsskorreleret sammenhæng mellem reendotelialisering og kvalitative ændringer i bindevævs organisering.

EC's rolle i de reparative processer kan ikke entydigt udledes af ovenstående dokumentationer. Koincidenser mellem permeabilitetsændringer og ultrastrukturen af EC og neointimalt bindevæv i den helende aorta lader flere tolkningsmuligheder åbne for EC's rolle i helingsprocesserne.

A. EC's rolle beror alene på barrierefunktion og denne er ene-afgørende for forløbet af de reparative processer. EC genopretter den intimale barriere ved ukendte mekanismer, hvori reetablering af cellekontakter og metabolisk aktivitet synes at spille en rolle. Med reetableret barrierefunktion vil det underliggende bindevæv organiseres efter et lamelleret mønster, typisk for arterielt vævs grundstruktur. SMC's sekretion af matrixkomponenter var forstyrret som følge af svigtende barrierefunktion,

men normaliseres i kraft af genoprettelse af barrieren. Deres sekretoriske aktivitet beror alene på vaskulære SMC's indbyggede evne til at vokse lagvis og danne matrix rig på MB-lignende substans og elastin.

B. EC spiller en dobbeltrolle som integreret del af den intime barriere og bidrager sammen med nærliggende SMC ved sekretorisk aktivitet til dannelsen af et bøv. matrix filter, som indgår i den intime barriere. Dannelsen af lamelleret myoelastisk væv i de dybere lag af neointima beror både på barrierefunktionen (conf. A) og på styrende indflydelse fra EC, hvorved de reparative processer får et forløb, som genspejler organiseringen af voksende organismers arterier.

C. EC spiller en dobbeltrolle (jf. B). Reetablering af barrierefunktionen er alene årsag til, at de reparative processer præges af lamelleret myoelastisk væv (jf. A), beroende på autonom bindevævsdannelse af SMC.

Endotelets rolle kan indirekte tolkes ud fra ultrastrukturen af bindevæv, hvor EC ikke er til stede (pseudoendotel eller denuderet flade). De reparative processer præges af defekter i bindevævsdannelsen, især m.h.t. elastogenese, dannelse af MB-substans og rumlig organisering af celler og matrix. I sene faser ligner forandringerne arvæv. De foreliggende dokumentationer tillader ingen slutning om, hvorvidt det afsporede forløb af de reparative processer hænger sammen med forstyrrende indvirkning af plasmakomponenter og/eller med manglende vækstregulerende indflydelse af EC.

Perspektiver

Ifølge den myogene atherogeneseteori har EC betydning i kraft af barrierefunktionen. Negativt - ved deendotelialisering - får stoffer fra blodbanen med stimulerende virkning på SMC adgang til intima, og SMC igangsætter en hyperplastisk reaktion, som kan blive irreversibel, hvis lipider trænger ind. Positivt - ved reendotelialisering - kan reetablering af barrieren bringe små foci af prolifererende SMC og bindevævsmatrix til at svinde helt, og større reaktioner som neointimal hyperplasi efter ballonlæsionen regredierer i et vist omfang.

Nærværende arbejde bekræfter EC's afgørende rolle i barrierefunktionen og SMC's betydning for den hyperplastiske reaktion. Men EC synes derudover at have betydning for bindevævsdannelsen. Denne hypotese kan få betydning for nyvurdering af karbeskadigende faktorerers virkningsmekanisme og stimulere forstærket efterforskning af sekvenser i EC's deltagelse i det reparative respons. EC viste stærkt varieret ultrastruktur afhængigt af, om de var randstillede, prolifererende eller konsolideret i overflademønsteret, og samtidige variationer i bindevævsstruktur og neointima's permeabilitet var tydelige. In natura kan småtraumer af karvægge ("localizing factors") sandsynligvis udløse nogle af disse forandringer uden massiv deendotelialisering, og forstyrrede metaboliske interaktioner mellem EC og SMC kan være implicerede i tidlige atherosclerotiske forandringer.

Hypotesen kan efterprøves eksperimentelt. EC's sekretion af fibronectin (LETS protein) kunne efterprøves i et ballonforsøg, lettest hvis det var muligt at fremstille antistof mod LETS protein og anvende dette til påvisning af stoffet i vævet ved en morfologisk metode, f.eks. immunofluorescensmikroskopi. Hvis hypotesen holder stik, ville en kumulation af stoffet kunne forventes i karrets lumenale zone nærmest

endotelet, men være sparsom og anderledes fordelt under pseudo-endotel.

Til studiet af metaboliske aspekter knyttet til prolifererende EC's migration, prolifération og konsolidering i cellemønsteret ville en cirkumskript mekanisk forsøgsmodel med deendotelialisering af mindre omfang end ballonlæsionen og heling på få uger give mere overskuelige arbejdsforhold. Avanceret TEM teknik applikeret på EC's kontakter med naboceller, sekretoriske og stoftransporterende egenskaber og indflydelse på SMC's bindevævsdannelse og elastogenese vil kunne forventes at kaste nyt lys over samkædede problemer udledt af nærværende arbejde.

SUMMARY

Various aspects of differing theories regarding the genesis of atherosclerosis are surveyed and different opinions derived from experimental investigations presented. The present investigation, which aims at studies of the role of EC in the healing processes of arterial tissue, was planned on the assumption that the connective tissue of blood vessels, both in experimental lesions and human arteriosclerosis, takes part in unspecific healing reactions, which are generally similar irrespective of the type of trauma.

Chapter I

SEM and silver staining of the aorta with fixation of the vessel in situ is a simple and reproducible method. The EC pattern is clearly presented and the method is well-suited for controlling the integrity of the endothelial surface.

The silver-line pattern consisted of slightly wavy, elevated silver-lines with regularly occurring nodular thickenings. The silver-lines were approximately $1\text{ }\mu\text{m}$ thick and situated on top of the EC border zones. They outline the EC as elongated, rhombic fields orientated with their long axis parallel to the long axis of the vessel. Centrally, in these fields, contours of oval and slightly elevated nuclei could frequently be observed. The silver-line pattern in SEM agrees well with the appearance of silver-stained intima in the light microscope. Using the number of cells per mm^2 as the criterion, the SEM method appears to have produced a greater shrinkage of tissue than the light microscopic method. Innumerable details, unknown from light microscopy, mark the three-dimensional picture obtained by SEM. The most conspicuous were the coarse longitudinal folds, brought about by folding of the internal elastic membrane, as well as numerous artefacts consisting of shrinking, rolling-up and partial loosening of the EC. The endothelial surface was marked by small roundish elevations, which were less pronounced in the

non-silver stained preparations. The silver-line pattern covered the border zones of the EC, which in non-silver stained preparations showed inconspicuous marginal folds.

The ideal procedure for the production of SEM preparations of arteries and the presentation of a real three-dimensional picture of the intima is still unclarified and still under debate. The procedure cannot be standardized and is dependent on the investigational protocol and achieved routine. But methods practiced within the individual laboratories have been found to give reproducible results, which are comparable from experimental animal to experimental animal and from one experimental series to another. In the discussion regarding the method of preparation, the main emphasis has been, in later years, on prolonged perfusion fixation using physiological pressure, the use of buffered fixation fluids with the vehicle as the critical isosmotic component and the use of CPD in the dehydration process. The coarse longitudinal folds can be eliminated by means of prolonged pressure fixation, and the majority of authors consider these as being artificial. There is considerable disagreement regarding the presentation of marginal folds in the EC and various details of the cell surface, such as villous protrusions and small holes; the latter possibly representing pinocytosis. The composition of the flushing medium appears to have some influence on the production of the cellular details, and the question artefact or non-artefact is still unclarified.

In the present investigation, the composition of the preparation fluid has not been ideal and the coarse longitudinal folds in the internal elastic membrane were not eliminated by the pressure fixation. Silver staining of the aorta for SEM has been found to be a robust method, considerably independent of the composition of the preparation fluid, the length of the various phases of the individual processes and the dehydration technique. One of the disadvantages of the method is the use of silver nitrate, which in addition to attacking the finer structures of the cell surface, also covers the border zones of the EC in the area of the silver-lines and to a lesser extent settles diffusely over

the surface. The method is unsuitable for the study of finer cellular structures. The advantages of it lie in the fact that differences in the experimental conditions and preparation procedures do not prevent reproducible production of a uniform silver-line pattern which is clear and permits simple control of the integrity of the EC surface and allows direct comparison between the results of various research groups.

Chapter II

The avascular connective tissue of the arterial wall, which is permanently exposed to haemodynamic stress and expansion due to the pulse wave, is emphasized as being unique with regard to the conditions for the completion of the healing process. Methods are mentioned for the demonstration of the importance of local factors for the multifocal occurrence of arteriosclerosis. Techniques for the production of experimental arteriosclerosis are summarized and examples of mechanical experimental models mentioned. Fibromyoelastic hyperplasia is compared to neointimal hyperplasia following mechanical lesion and similarities emphasized. An attempt is made to characterize the relevance of the pathophysiology of the balloon and noradrenaline models.

EC injury and reparative changes in the thoracic aorta were studied after balloon lesions and lesions caused by noradrenaline in toxic doses.

The balloon technique triggers a subtotal lesion of the thoracic aorta with total or partial abrasion of the intima. Macroscopic arteriosclerotic changes developed within 14 days, and these were accompanied by inflammatory changes, necrosis, calcification and a reparative process with the formation of a neointima of several cell layers in thickness. The denuded intimal surface was covered within the first 24 hours by a mono-layer of thrombocytes and blood cells, and after 8 days, the surface presented the same elements as can be identified six months later: endothelium, pseudoendothelium and denuded surfaces. The endothelium expands as continuous plaques in continuity with the pre-existing

endothelium at the mouths of ICA and at the borders of the lesion, expands over denuded surfaces and replaces the pseudo-endothelium. The expansion occurs most rapidly in the first 3 weeks, after which it is slow and had not been completed six months later. Hexagonal endothelium is prominent where the vessel is locally or generally dilatated and can possibly be explained here as the adaption by EC to the dilatated vessel wall. In the border zone, towards the pseudoendothelium or denuded surfaces, the hexagonal endothelium dominated, mixed with endothelial giant cells. These giant cells can be seen on the denuded surfaces, partly free-lying out from the edges of the expanding endothelium. The border zones between the endothelium and pseudoendothelium are extremely distinct. Supported by later observations based on nuclear stained Häutchen specimens and TEM, the expansion of the endothelium appears to be based on proliferation of EC in the area close to the border zone and wandering of EC over the pseudo-endothelium without interposition of connective tissue. In the border zones, the hexagonal endothelium and giant cells represent proliferative changes in the expanding endothelium.

The pseudoendothelium has never been observed in continuity with genuine endothelium and presented a bizarre pattern of silver-lines intermixed with "eyes", which accumulated at the meeting sites of the cells. The study using SEM gave no explanation of the formation of pseudoendothelium, and some observations even suggested that free mesenchymal cells, possibly macrophages (monocytes) could become integrated in the surface as pseudo-endothelium. Later analyses using the Häutchen technique and TEM indicated that pseudoendothelium is surface-forming SMC with interdigitating marginal zones which do not establish actual contact. The bizarre appearance of the silver-line pattern with SEM and surface light microscopy, presumably results from silver deposition on the highly branched interdigitating marginal zones of the SMC.

The morphology of the cell pattern was dependent on the level of the surface, inasmuch as both EC and pseudoendothelium were frequently polarized at right angles to the longitudinal axis of the

vessel as a component of a whirling pattern related to the surface by cristae, ridges and excavations. Haemodynamic effects triggered by unevenness of the surface can explain the polarization of the cells.

Thrombotic changes were slight. Actual thromboses were never observed and thrombocytes were not seen adhering to living EC or to pseudoendothelium. Thrombocytes adhered to the denuded surfaces together with blood cells in an inhomogeneous mono-layer to the devitalized endothelium and to an amorphous filamentous substance, which could not be identified.

The value of SEM as a method for the study of healing intimal surfaces is based on optimal conditions for the correlation of the morphology of the cell patterns with variations in the relief of the intimal surface and the possibility of studying free cells and their relationship to surface cells and/or filamentous elements. A disadvantage of the SEM method is the superfluity of detailed information which made a clear view and sober evaluation of the details difficult. The type of filamentous substance could not be identified and certain differences in the level between pseudoendothelium and endothelium were artefacts, which could have resulted in misinterpretation of the mechanism of endothelial expansion. Complete utilization of the large amount of information obtainable from the scanning electron microscope and the other technical advantages of this instrument, in extensive studies of the reparative response of blood vessels, will necessitate the use of improved preparation techniques without silver staining.

Studies of the healing process after balloon lesions showed that the re-endothelialization of the rabbit aorta was at first rapid, and then slow and that this was not complete six months after the initial lesion. Re-endothelialization with genuine endothelium took place from previously existing endothelium, while the pseudoendothelium consisted of cells from other origins. The conditions for re-endothelialization were good taking into consideration the wide border zone facing the non-injured field and many ICA mouths

with intact endothelium. An extensive trauma of considerable force affecting an animal with limited reparative potential is possibly the explanation of the slow re-endothelialization.

Noradrenaline lesions produced in two independent experiments were induced by the daily intravenous injection of noradrenaline in toxic doses over a period of 15 minutes, with a pause of 5 minutes. The effect of 1 mg noradrenaline daily for 14 days, with autopsy on the 17th day, was studied first in an investigation using SEM, surface light microscopy and examination of half-thin araldite sections. In another study the effect of the same daily dosage was semi-quantitated by varying the number of injections and length of survival time.

Noradrenaline brought about excessive hypertension, stupor and pulmonary oedema in connection with the injection, but the blood pressure normalized promptly after cessation of the injection. Ascites, hydrothorax and dilatation of the aorta with macroscopic arteriosclerotic changes were frequent. Thickening of the intima, increased interlaminae substance in the media, focal median necrosis, calcification and round cell infiltration were prominent histological changes. Mainly normal silver-line patterns were observed when using SEM and light microscopy. Hexagonal endothelium of the same appearance as that in the balloon experiments was widespread, particularly in the areas where the arterial wall was dilated and/or macroscopically changed. Silver-binding cells, which had never been observed in the balloon experiments, occurred alone or in small clusters and appeared in SEM as strongly reflecting, slightly shrunken cells with prominent nuclear profiles and on light microscopic examination as brown cells with unstained nuclear zones. Hexagonal endothelium was, similar to the occurrence of intimal thickening, positively correlated to survival time and to a lesser degree to the number of noradrenaline injections. The silver-binding cells occurred, in the main, in the experiment based on one noradrenaline injection, whereas the length of the survival time did not appear to play any role. The pathogenetic mechanism behind the effect of noradrenaline on the connective tissue of the arterial wall is unknown, but hypoxia

and a direct metabolic effect on SMC is possible. The mode of reaction of endothelial cells to noradrenaline probably depends on different mechanisms. The hexagonal endothelium can be related to the dilatation of the arterial wall and similar to the balloon experiments, be interpreted as mechanical adaption to increased intimal surface and/or represent proliferative changes. The silver-binding cells could be both damaged/dead and/or newly formed proliferating cells. Their occurrence is a possible direct effect of noradrenaline, contingent on the susceptibility of EC to the injurious and/or growth stimulating effect of noradrenaline and to the influence of "localizing factors" in connection with hypertension, contraction of the artery and macroscopic changes. The major part of the evidence would certainly not indicate any direct relationship between silver-binding cells and hexagonal endothelium.

Comparison of the results from the noradrenaline and balloon lesions suggests that the response of EC is uniform and that the difference in this can be related to the method of induction. Hexagonal endothelium was a common feature occurring together with the reparative and arteriosclerotic changes. Pseudoendothelium occurred in the balloon experiments only and results from surface formation of modified SMC. A prerequisite to pseudoendothelium is extensive de-endothelialization and is presumably a pathophysiologically irrelevant change, which does not occur in the intact organism. Silver-binding cells occurred in the noradrenaline experiments only and presumably result from a direct effect of the noradrenaline.

The balloon experiment was selected as that best suited to future studies, inasmuch as the time of the lesion is known and the healing process in the connective tissue can be compared between areas covered by endothelium and areas which do not become re-endothelialized.

Chapter III

The myogenic atherogenesis theory is quoted, and various opinions

regarding the participation of EC and SMC in the reparative changes are quoted from other sources. Vital staining with Evans blue of the normal and damaged aorta is mentioned and unsolved problems regarding the permeability of the endothelium pointed out. The problems of importance with regard to future planning of the work are formulated.

The permeability of the healing endothelium is correlated to the light microscopic and TEM appearance of the surface in two individual experiments, based on the balloon lesion. In the first study, the surface light microscopic appearance was correlated to vital staining using Evans blue. In the second study, vital staining was correlated to TEM in order to evaluate the coincidental changes in the ultrastructure of the endothelium and the connective tissue correlated to the changes in permeability.

The first study demonstrated that the presence of EC was decisive with regard to the re-establishment of an intimal barrier. The newly formed endothelium was partly permeable, but became impermeable with time. The non-endothelial covered areas remained macroscopically blue, but fluorescence microscopy showed a time correlated decreasing permeability. The morphological studies provided no explanation of this, but indicated that the age of the EC and its proliferative activity is of importance to the permeability of the intima.

In the second study, closely lying biopsies were removed for TEM and fluorescence microscopy from vital stained areas of the aorta, in order to compare areas of the intima at various "ages" of re-endothelialization. Newly formed endothelium was extremely permeable in the first week as shown by fluorescence microscopy and demonstrated incomplete cell contacts and poor secretory equipment. Changes in the EC, subendothelial connective tissue and the permeability of the intima, occurred around the 21st day. EC develop secretory equipment, endocytotic activity and wide cell contacts with differentiated junctions. The subendothelial connective tissue becomes condensed and is marked by subendothelial rMB,

secreting myointimal cells and elastogenesis. EC in the border zones of the expanding endothelium remained unchanged throughout the whole of the experimental period. They showed no secretory activity, had incomplete cell contacts and their organel equipment suggested migration, further the pseudoendothelium was overgrown by EC without interposition of connective tissue. In the following weeks EC remained totally impermeable apart from the EC in the border zones, which remained permeable throughout the whole of the experimental period. The pseudoendothelium consisted of flattened modified SMC with declivatively situated nuclei, luminal zones with clumped microfilaments and thin extremely interdigitated border zones without any actual cell contact. The underlying connective tissue was slightly condensed and showed increasing fibrosis.

The deeper neointimal connective tissue in the areas covered by endothelium was well-organized myoelastic tissue with intact elastogenesis. In the areas not covered by EC, the components of the neointimal connective tissue were poorly arranged, had defective elastogenesis and showed, in later experiments, a tendency to fibrosis. A semiquantitative registration indicated that re-endothelialization modifies the healing process, so that the course becomes similar to re-modelling and reconstruction of the basic structure of the arterial tissue following the organization pattern known from embryonal development. Little-known steps in the process of elastogenesis are implicated. The secretory activity of EC and SMC appears to be integrated in the build-up of a subendothelial muralium of rMB, glycosaminoglycans, pre-elastin and incomplete elastic lamellae. The formation by SMC of MB-like substance, the integration of this into elastin-corns and their incorporation by means of microfilaments into larger elements, takes place in the deeper layers of the neointima.

The role of EC in the healing process can be contingent alone on the importance of these with regard to barrier function. The establishment of wide cell contacts and differentiation of 5-layered cell junctions can be a decisive factor. The role of EC

in the barrier function may also be double, partly based on the incorporation of EC into the border layer of blood/tissue, but also on an integrated metabolic activity between EC and SMC as a prerequisite to the formation of subendothelial muralium of matrix components with filter properties against macromolecules. The organization of the deeper subendothelial tissue as lamellated myoelastic tissue may be caused by the autonome connective tissue formation by SMC, which is permitted due to the re-establishment of the intimal barrier. But a process of growth induction of SMC triggered by EC, for example by the secretion of LETS protein, also termed fibronectin, is an additional possibility.

Prospectives

The present study confirms the reaction of EC and SMC as described by other authors in studies forming the basis of the myogenic atherosclerosis theory. The present hypothesis regarding the importance of EC in the formation of connective tissue is considered as being vital for a new evaluation of the mode of action of factors injuring the arterial wall, and that it will stimulate further study of the sequences in the participation by EC in the reparative response. Further experimental work is suggested based on tracing LETS protein in the healing aorta endothelium by means of immunohistological methods.

Time-correlated sequences in the reparative response by EC should be studied using advanced TEM techniques on circumscribed mechanical experimental models in order to investigate the relationship between the establishment of cell contacts, the changes in organel equipment and connective tissue formation.

LITTERATURFORTEGNELSE

- Archard, C. & M. Aynaud: Sur les conditions histo-chimiques de l'imprégnation par l'argent. C.R. Soc. Biol. (Paris) 1906, 61: 43-44. (7).
- Archard, C. & M. Aynaud: Recherches sur l'impregnation histologique de l'endothelium. Arch. Méd. exp. 1907, 19: 437-458. (7, 8).
- Adams, C.W.M.: Tissue changes and lipid entry in developing atheroma. Symposium on mechanisms in the development of early atheroma, London 1972: Atherogenesis: Initiating factors. Ciba Foundation Symposium 12 (new series). Amsterdam, London, New York: Elsevier, Excerpta Medica 1973, pp. 5-30. (3).
- Albert, E.N. & R.K. Nayak: Surface morphology of human aorta as revealed by the scanning electron microscope. Anat. Rec. 1976, 185: 223-234. (20, 21).
- Altschul, R.: Endothelium. Its development, morphology, function, and pathology. New York: The Macmillan Co. 1954, p. 10. (7).
- Anderson, T.F.: Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron-microscope. Trans. N.Y. Acad. Sci. 1951, 13: 130-134. (9).
- Anitschkow, N.: Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. Beitr. path. Anat. 1913, 56: 379-404. (3, 24).
- Anitschkow, N.: Experimental arteriosclerosis in animals. E.V. Cowdry: Arteriosclerosis. A survey of the problem. New York: The Macmillan Co. 1933, pp. 271-322. (24, 25, 46).
- Anitschkow, N.: A history of experimentation on arterial atherosclerosis in animals. H.T. Blumenthal: Cowdry's arteriosclerosis. A survey of the problem. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas 1967, pp. 21-44. (24).
- Backwinkel, K.-P., H. Themann, G. Schmitt & W.H. Hauss: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Verhalten glatter Muskelzellen in der Arterienwand unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Virchows Arch. Abt. A. 1973, 359: 171-184. (56).

- Baló, J. von: Die Wirkung des Thyroxins auf die Arterien. Beitr. path. Anat. 1939, 102: 341-360. (25).
- Bannister, C.M., L.A. Mundy & J.E. Mundy: A scanning electron microscopy study of the endothelial folds in normal and anastomosed common carotid arteries in albino rats. Brit. J. exp. Path. 1975, 56: 329-337. (10, 18).
- Baumgartner, H.R. & A. Studer: Gezielte Überdehnung der Aorta abdominalis am normo- und hypercholesterinaemischen Kaninchen. Path. et Microbiol. (Basel). 1963, 26: 129-148. (26).
- Bell, F.P., J.B. Somer, I.H. Craig & C.J. Schwartz: Patterns of aortic Evans blue uptake in vivo and in vitro. Atherosclerosis 1972, 16: 369-375. (24, 59, 76).
- Bell, F.P., A.S. Gallus & C.J. Schwartz: Focal and regional patterns of uptake and the transmural distribution of ¹³¹I-fibrinogen in the pig aorta in vivo. Exp. molec. Path. 1974, 20: 281-292. (24, 76).
- Benninghoff, A.: Blutgefäße und Herz. W.von Möllendorff: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, VI/1. Berlin: Springer 1930, pp. 25-30. (7).
- Bierring, F. & T. Kobayasi: Electron microscopy of the normal rabbit aorta. Acta path. microbiol. scand. 1963, 57: 154-168. (70, 88).
- Björkerud, S.: Reaction of the aortic wall of the rabbit after superficial, longitudinal, mechanical trauma. Virchows Arch. Abt. A. 1969, 347: 197-210. (25, 26, 38, 56, 57, 85).
- Björkerud, S. & G. Bondjers: Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. Part 1. Permeability and light microscopic characteristics of endothelium in non-atherosclerotic and atherosclerotic lesions. Atherosclerosis 1971a, 13: 355-363. (25, 32, 34, 59, 76, 85).
- Björkerud, S. & G. Bondjers: Arterial repair and atherosclerosis after mechanical injury. Part 2. Tissue response after induction of a total local necrosis (deep longitudinal injury). Atherosclerosis 1971b, 14: 259-276. (25, 32, 38, 56, 57, 85, 87).
- Björkerud S. & G. Bondjers: Endothelial integrity and viability in the aorta of the normal rabbit and rat as evaluated with dye exclusion tests and interference contrast microscopy. Atherosclerosis 1972, 15: 285-300. (24).

- Björkerud, S., H.-A. Hansson & G. Bondjers: Subcellular valves and canaliculi in arterial endothelium and their equivalence to so-called stigmata. *Virchows Arch. Abt. B.* 1972, 11: 19-23. (78).
- Björkerud, S.: Relationship of endothelium to smooth muscle. Overview. S. Wolf & N.T. Werthessen: The smooth muscle of the artery. New York, London: Plenum Press 1975, pp. 180-253. (38).
- Bowyer, D.E.: SEM and the surface coat. Discussion on reliable assessment of endothelial morphology of arteries by SEM. *Progr. biochem. Pharmacol.* 1977, 13: 192-195. (8, 10, 16, 19, 22).
- Bowyer, D.E., P.F. Davies, M.A. Reidy, T.B. Goode & E.S. Green: Scanning electron microscopy of arterial endothelium. *Progr. biochem. Pharmacol.* 1977, 13: 164-170. (8, 9, 10, 11, 19, 49, 50).
- Boyde A. & C. Wood: Preparation of animal tissues for surface-scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy* 1969, 90: 221-249. (9).
- Boyde, A.: Biological specimen preparation for the scanning electron microscope - an overview. O. Johari & I. Corvin: Scanning electron microscopy. Chicago: ITT Research Institute 1972, pp. 257-264. (9).
- Boyde, A. & P. Echlin: Freezing and freeze-drying - a preparative technique for SEM. O. Johari & I. Corvin: Scanning electron microscopy. Chicago: ITT REsearch Institute 1973, pp. 759-766. (9).
- Braun, L.: Über Adrenalinarteriosklerose. S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. 1907, 116: 3-24. (3, 25, 46).
- Bronte-Stewart, B. & R.H. Heptinstall: The relationship between experimental hypertension and cholesterol-induced atheroma in rabbits. *J. Path. Bact.* 1954, 68: 407-417. (25).
- Bruns, R.R. & G.E. Palade: Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. *J. Cell Biol.* 1968, 37: 277-299. (60).
- Buck, R.C.: Intimal thickening after ligation of arteries. An electron-microscopic study. *Circulat. Res.* 1961, 9: 418-426. (23, 25, 56).

- Buck, R.C.: Histogenesis and morphology of arterial tissue.
M. Sandler & G.H. Bourne: Atherosclerosis and its origin.
New York, London: Academic Press 1963, pp. 1-38. (23, 55,
56, 69, 88).
- Buck, R.C.: Organ cultures of rat aorta: A scanning and transmis-
sion electron microscopic study. *Exp. molec. Path.* 1977, 26:
260-276. (55, 86).
- Burri, P.H. & E.R. Weibel: Beeinflussung einer spezifischen cyto-
plasmatischen Organelle von Endothelzellen durch Adrenalin.
Z. Zellforsch. 1968, 88: 426-440. (47).
- Caplan, B.A. & C.J. Schwartz: Increased endothelial cell turnover
in areas of in vivo Evans blue uptake in the pig aorta.
Atherosclerosis 1973, 17: 401-417. (24, 49, 76).
- Caplan, B.A., R.G. Gerrity & C.J. Schwartz: Endothelial cell
morphology in focal areas of in vivo Evans blue uptake in
the young pig aorta. I. Quantitative light microscopic find-
ings. *Exp. molec. Path.* 1974, 21: 102-117. (24, 33, 58, 76,
78).
- Cavallero, C., U. Di Tondo, P.L. Mingazzini, L.G. Spagnoli &
M. Cavallero: Cellular proliferation in the arterial walls
of epinephrine-treated rabbits. *Experientia (Basel)* 1972,
28: 265-266. (25, 46).
- Chisolm, G.M., J.L. Gainer, G.E. Stoner & J.V. Gainer, Jr.:
Plasma proteins, oxygen transport and atherosclerosis.
Atherosclerosis 1972, 15: 327-343. (17).
- Chisolm, G.M., J.L. Gainer & G.E. Stoner: SEM (scanning electron
microscope) studies of aortic structure. *Angiologica* 1973,
10: 10-14. (17).
- Clark, J.M. & S. Glagov: Luminal surface of distended arteries
by scanning electron microscopy: eliminating configurational
and technical artefacts. *Brit. J. exp. Path.* 1976, 57: 129-
135. (8, 17, 20, 21).
- Cliff, W.J.: The aortic tunica media in growing rats studied with
the electron microscope. *Lab. Invest.* 1967, 17: 599-615.
(87, 88).

- Clowes, A.W. & M.J. Karnovsky: Failure of certain antiplatelet drugs to affect myointimal thickening following arterial endothelial injury in the rat. *Lab. Invest.* 1977a, 36: 452-464. (26, 35, 55, 56, 57).
- Clowes, A.W. & M.J. Karnovsky: Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. *Nature (Lond.)* 1977b, 265: 625-626. (26, 35, 55, 56, 57).
- Clowes, A.W., R.E. Collazzo & M.J. Karnovsky: A morphologic and permeability study of luminal smooth muscle cells after arterial injury in the rat. *Lab. Invest.* 1978, 39: 141-150. (26, 35, 55, 56, 57, 59, 76, 81, 82).
- Collatz Christensen, B.: Personal communication, 1975. (50).
- Constantinides, P., N. Gutmann-Auersperg & D. Hospes: Acceleration of intimal atherogenesis through prior medial injury. *Arch. Path.* 1958, 66: 247-254. (25).
- Constantinides, P.: Production of experimental atherosclerosis in animals. *J. Atheroscler. Res.* 1961, 1: 374-385. (25).
- Constantinides, P.: Experimental atherosclerosis. Amsterdam, London, New York: Elsevier Publishing Co. 1965. (25).
- Constantinides, P.: The important role of endothelial changes in atherogenesis. T. Shimamoto, F. Numano & G.M. Addison Car-diff: *Atherogenesis*, Vol. II. Amsterdam, Excerpta Medica 1973, pp. 51-61. (47).
- Cotton, R. & W.B. Wartman: Endothelial patterns in human arteries. Their relationship to age, vessel site and atherosclerosis. *Arch. Path.* 1961, 71: 15-24. (7, 33, 36).
- Cotton, R.E., T.R. Harwood & W.B. Wartman: Regeneration of aortic endothelium. *J. Path. Bact.* 1961, 81: 175-180. (25, 32, 34, 36, 38).
- Cox, G.E., R.E. Trueheart, J. Kaplan & C.B. Taylor: Atherosclerosis in rhesus monkeys. IV. Repair of arterial injury. - An important secondary atherogenic factor. *Arch. Path.* 1963, 76: 166-176. (25).
- Curran, R.C.: The elaboration of mucopolysaccharides by vascular endothelium. *J. Path. Bact.* 1957, 74: 347-352. (84).

- Davies, P.F. & D.E. Bowyer: Scanning electron microscopy: Arterial endothelial integrity after fixation at physiological pressure. *Atherosclerosis* 1975, 21: 463-469. (10, 18, 19, 20).
- Davies, P.F., M.A. Reidy, T.B. Goode, & D.E. Bowyer: Scanning electron microscopy in the evaluation of endothelial integrity of the fatty lesion in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1976, 25: 125-130. (9, 10, 19).
- De Bruijn, W.C., W. van Mourik & I.J. Bosveld: Cell border demarcation in the scanning electron microscope by silver stains. *J. Cell Sci.* 1974, 16: 221-239. (10, 15, 19).
- Duff, G.L.: Medial degeneration in the aorta of the rabbit produced by diphtheria toxin. *Arch. Path.* 1932, 13: 543-557. (25).
- Duff, G.L.: Experimental cholesterol arteriosclerosis and its relationship to human arteriosclerosis. VIII. Etiology and pathogenesis of experimental cholesterol arteriosclerosis in rabbits. *Arch. Path.* 1935, 20: 259-304. (25).
- Duncan, L.E.: Mechanical factors in the localization of atheromata. R.J. Jones: Evolution of the atherosclerotic plaque. Chicago: University Press 1963, pp. 171-182. (54).
- Dury, A. & L.D. Moss: Experimental arteriosclerosis: Effect of repeated intravenous injections of epinephrine on lipid partition of plasma and liver and aortic degenerative changes in intact rabbits. *J. Geront.* 1954, 9: 287-295. (47).
- Edenaga, M.: A scanning electron microscope study on the endothelium of the vessels. I. Fine structure of the endothelial surface of aorta and some other arteries in normal rabbits. *Arch. histol. jap.* 1974, 37: 1-14. (20, 21).
- Edenaga, M.: A scanning electron microscope study on the endothelium of vessels. II. Fine structure of the endocardium in normal rabbits and rats. *Arch. histol. jap.* 1975, 37: 301-312. (20).
- Efskind, L.: Veränderungen des Gefäßepithels nach Röntgenbestrahlung. *Acta path. microbiol. scand.* 1940-41, 481-493, 17-18. (26, 36).

- Efskind, L.: Die Regenerationsverhältnisse im Intimaepithel nach Gefäß-Sutur. *Acta chir. scand.* 1941, 84: 283-309. (7, 18, 25, 32, 34, 36).
- Fallon, J.T. & W.E. Stehbens: Venous endothelium of experimental arteriovenous fistulas in rabbits. *Circulat. Res.* 1972, 31: 546-536. (25, 32, 34, 35, 36).
- Fallon, J.T., W.E. Stehbens & R.C. Eggleton: Effect of ultrasound on arteries. *Arch. Path.* 1972, 94: 380-388. (26).
- Fallon, J.T. & W.E. Stehbens: The endothelium of experimental saccular aneurysms of the abdominal aorta in rabbits. *Brit. J. exp. Path.* 1973, 54: 13-19. (32, 35, 49).
- Fisher, E.R., D.L. Creed & W.F. Baird: Effect of renal hypertension on cholesterol atherosclerosis in the rabbit. I. Histo-pathologic and biochemical studies. *Lab. Invest.* 1958, 7: 231-247. (25).
- Fishman, J.A., G.B. Ryan & M.J. Yarnovsky: Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab. Invest.* 1975, 32: 339-351 (26, 38, 55, 56).
- Flaherty, J.T., V.J. Ferrans, J.E. Pierce, T.E. Carew & D.L. Fry: Localizing factors in experimental atherosclerosis. W. Likoff, B.L. Segal, W. Insull & J.H. Moyer: Atherosclerosis and coronary heart disease. New York, London: Grune & Stratton 1972a, pp. 40-84. (24, 49).
- Flaherty, J.T., J.E. Pierce, V.J. Ferrans, D.J. Patel, W.K. Tucker & D.L. Fry: Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. *Circulat. Res.* 1972b, 30: 23-33. (24, 35).
- Florey, H.W., J.C.F. Poole & G.A. Meek: Endothelial cells and "cement" lines. *J. Path. Bact.* 1959, 77: 625-636. (7, 19, 35, 77).
- Florey, H.W. & L.H. Grant: Leucocyte migration from small blood vessels stimulated with ultraviolet light: an electron-microscope study. *J. Path. Bact.* 1961, 82: 13-17. (37)
- Florey, H.W., S.J. Greer, J.C.F. Poole & N.T. Werthessen: The pseudointima lining fabric grafts of the aorta. *Brit. J. exp. Path.* 1961, 42: 236-246. (32, 34, 35, 38, 88).

- Florey, H.W., S.J. Greer, J. Kiser, J.C.F. Poole, R. Telander & N.T. Werthessen: The development of the pseudointima lining fabric grafts of the aorta. *Brit. J. exp. Path.* 1962, 43: 655-660. (32, 34, 35, 38, 88).
- Florey, H.W. & B.L. Sheppard: The permeability of arterial endothelium to horseradish peroxidase. *Proc. roy. Soc. B.* 1970, 174: 435-443. (59).
- French, J.E.: Endothelial structure and function. R. Jones: Evolution of the atherosclerotic plaques. Chicago, London: The University of Chicago Press 1963, pp. 15-28. (60).
- French, J.E., M.A. Jennings, J.C.F. Poole, D.S. Robinson & H.W. Florey: Intimal changes in the arteries of ageing swine. *Proc. roy. Soc. B. Sci.* 1963, 158: 24-42. (26, 88).
- French, J.E., M.A. Jennings & H.W. Florey: Morphological studies on atherosclerosis in swine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1965, 127: 780-799. (26, 88).
- French, J.E.: Atherosclerosis in relation to the structure and function of the arterial intima, with special reference to the endothelium. G.W. Richter & M.A. Epstein: *Int. Rev. exp. Path.*, vol. 5. New York: Academic Press 1966, pp. 253-353. (54, 55, 69, 88).
- Freudenberg, N. & U. Häublein: The effect of endotoxin shock on the aortic endothelium of young rats. *Beitr. Path.* 1975, 156: 1-15. (25).
- Friedland, I.B.: Untersuchungen über den Einfluss der Schilddrüs-enpräparate auf die experimentelle Hypercholesterinemie und Atherosclerose. *Z. ges. exp. Med.* 1933, 87: 683-702. (25).
- Friedman, B., Y.T. Oester & O.F. Davis: The effect of arterenol and epinephrine on experimental arteriopathy. *Arch. int. Pharmacodyn* 1955, 102: 226-234. (25, 46, 47).
- Friedman, M. & S.O. Byers: Endothelial permeability in atherosclerosis. *Arch. Path.* 1963, 76: 99-105. (24, 60).
- Friedman, M. & S.O. Byers: Aortic atherosclerosis intensification in rabbits by prior endothelial denudation. *Arch. Path.* 1965, 79: 345-356. (25).
- Friedman, R.J., M.B. Stemerman, B. Wenz, S. Moore, J. Gauldie, M. Gent, M.L. Tiell & T.H. Spaet: The effect of thrombocytopenia on experimental arteriosclerotic lesion formation in

- rabbits. Smooth muscle cell proliferation and re-endothelialization. J. clin. Invest. 1977, 60: 1191-1201. (24).
- Frost, H., H. Hess & I. Richter: Untersuchungen zur Pathogenese der arteriellen Verschlusskrankheiten. I. Eine neue Methode zum Studium früher Veränderungen auf der Gefäßwand. Klin. Wschr. 1968, 20: 1099-1104. (5).
- Fry, D.L.: Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients. Circulat. Res. 1968, 22: 165-197. (16, 49).
- Fry, D.L.: Localizing factors in arteriosclerosis. W. Likoff, B.L. Segal, W. Insull, & J.H. Moyer: Atherosclerosis and coronary heart disease. New York, London: Grune and Stratton 1972, pp. 85-104. (24, 49).
- Fry, D.L.: Responses of the arterial wall to certain physical factors. Symposium on mechanisms in the development of early atheroma, London 1972: Atherogenesis: Initiating factors. Amsterdam, London, New York: Elsevier, Excerpta Medica 1973, pp. 93-120. (49, 58).
- Fuchs, U.: Das innere Relief der normalen und arteriosklerotischen Aorta im Rasterelektronenmikroskop. Exp. Path. 1972, 7: 45-59. (18).
- Fuchs, U.: Scanning electron microscopy of the aorta. Progr. biochem. Pharmacol. 1977, 13: 182-184. (18).
- Fujimoto, S., K. Yamamoto & Y. Takeshige: Electron microscopy of endothelial microvilli of large arteries. Anat. Rec. 1975 183: 259-266. (20, 21).
- Gabbiani, G. & G. Majno: Endothelial microvilli in the vessels of the rat Gasserian ganglion and testis. Z. Zellforsch. 1969, 97: 111-117. (21).
- Garbarsch, C., M.E. Matthiessen, P. Helin & I. Lorenzen: Arteriosclerosis and hypoxia. Part 1. Gross and microscopic changes in rabbit aorta induced by systemic hypoxia. Histochemical studies. J. Atheroscler. Res. 1969, 9: 283-294. (4, 46).
- Garbarsch, C.: I. Distribution of urea-stable and urea-labile lactate dehydrogenase activity in rabbit aorta following a single mechanical dilatation injury; a histochemical study on methodology and histotopography. Acta histochem. (Jena) 1973a, 46: 288-299. (4, 29).

- Garbarsch, C.: II. Enzyme histochemistry of rabbit thoracic aorta following a single mechanical dilatation injury. *Acta histochem. (Jena)* 1973b, 46: 300-313. (4, 29).
- Garbarsch, C.: Aortavæggens reaktion på eksperimentel beskædigeelse. Histologiske og histokemiske studier over den reparative proces i aorta hos kanin. Thesis. København 1976. (27, 29, 44, 46).
- Gaynor, E.: Vascular lesions in endotoxemia. L.B. Hinshaw & B.G. Cox: The fundamental mechanisms of shock. Session III: Toxic factors in shock. New York, London: Plenum Press 1972, pp. 337-345. (25).
- Geissinger, H.D.: The use of silver nitrate as a stain for scanning electron microscopy of arterial intima and paraffin sections of kidney. *Journal of Microscopy* 1972, 95: 471-481. (10).
- Gerrity, R.G. & W.J. Cliff: The aortic tunica media of the developing rat. I. Quantitative stereologic and biochemical analysis. *Lab. Invest.* 1975, 32: 585-600. (87, 88).
- Gerrity, R.G., E.P. Adams & W.J. Cliff: The aortic tunica media of the developing rat. II. Incorporation by medial cells of ^3H -proline into collagen and elastin: Autoradiographic and chemical studies. *Lab. Invest.* 1975 32: 601-609. (87, 88).
- Gerrity, R.G., M. Richardson, B.A. Caplan, J.F. Cade, J. Hirsch & C.J. Schwartz: Endotoxin-induced vascular endothelial injury and repair. II. Focal injury, en face morphology, (^3H) thymidine uptake and circulating endothelial cells in the dog. *Exp. molec. Path.* 1976, 24: 59-69. (24, 25, 49, 51).
- Gerrity, R.G.: Some aspects of scanning electron microscopy techniques applied to the study of large arteries. *Progr. biochem. Pharmacol.* 1977, 13: 306-311. (8, 9).
- Gerrity, R.G., M. Richardson, J.B. Somer, F.P. Bell & C.J. Schwartz: Endothelial cell morphology in areas of in vivo Evans blue uptake in the aorta of young pigs. II. Ultrastructure of the intima in areas of differing permeability to proteins. *Amer. J. Path.* 1977, 89: 313-334. (24, 58, 76).

- Gertz, S.D., M.L. Rennels, M.S. Forbes & E. Nelson: Preparation of vascular endothelium for scanning electron microscopy: a comparison of the effects of perfusion and immersion fixation. *Journal of Microscopy* 1975, 105: 309-313. (8, 18, 21).
- Gillman, T. & M. Hathorn: Pathogenesis of arterial sclerosis, in the light of modern views on vascular microanatomy and the role of polysaccharides in wound healing. *J. Mt. Sinai Hosp.* 1957, 24: 857-868. (4, 88).
- Glagov, S.G. & C. Ts'ao: Restitution of aortic wall after sustained necrotizing transmural ligation injury. Role of blood cells and artery cells. *Amer. J. Path.* 1975, 79: 7-30. (25, 26, 55, 56).
- Glasunow, M.: Durchspülungsversuche mit Trypanblau an überlebenden Aorten. *Virchows Arch. path. Anat.* 1926, 261: 837-845. (57).
- Goode, T.B., P.F. Davies, M.A. Reidy & D.E. Bowyer: Aortic endothelial cell morphology observed in situ by scanning electron microscopy during atherogenesis in the rabbit. *Atherosclerosis* 1977, 27: 235-251. (9, 10, 19, 24, 34, 37, 49).
- Gospodarowicz, D., G. Greenburg, H. Bialecki & B.R. Zetter: Factors involved in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro: The role of the fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells. *In Vitro* 1978, 14: 85-118. (88).
- Gottlob, R. & G. Zinner: Ueber die Schädigung des Venenendothels durch verschiedene Noxen. *Wien. klin. Wschr.* 1959a, 71: 482-487. (19).
- Gottlob, R. & G. Zinner: Zur pathologischen Histologie der Venenendothelien, dargestellt mit der Versilberungsmethode. *Virchows Arch. path. Anat.* 1959b, 332: 398-406. (19).
- Gottlob, R. & G. Zinner: Über die Regeneration geschädigter Endothelien nach hartem und weichem Trauma. *Virchows Arch. path. Anat.* 1962, 336: 16-32. (25, 32, 33, 48, 49, 81).
- Gottlob, R. & H.F. Hoff: A study of the relation between endothelial silver lines, medial transverse silver lines, and the ultrastructural morphology of blood vessels. *Vasc. Surg.* 1967, 1: 92-100. (7, 8, 19).

- Groniowski, J., W. Biczyskova & M. Walski: Scanning electron microscopic observations on the surface of vascular endothelium. *Folia histochem. cytochem.* 1971, 9: 243-246. (17).
- Gross, L., E.Z. Epstein & M.A. Kugel: Histology of the coronary arteries and their branches in the human heart. *Amer. J. Path.* 1934, 10: 253-274. (26).
- Guski, H., R. Schmidt, H. Eckert & A. Golosubow: Histometrische Befunde nach Diffusions- und nach Perfusionsfixierung von Aorta und Organarterien bei Kaninchen. *Exp. Path.* 1971, 5: 154-162. (18).
- Harker, L.A., R. Ross, S.J. Slichter & C.R. Scott: Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J. clin. Invest.* 1976, 58: 731-741. (25, 54, 55).
- Hartman, J.D.: Structural changes within the media of coronary arteries related to intimal thickening. *Amer. J. Path.* 1977, 89: 13-34. (88).
- Haudenschild, C. & A. Studer: Early interactions between blood cells and severely damaged rabbit aorta. *Europ. J. clin. Invest.* 1971, 2: 1-7. (26).
- Haust, M.D., R.H. More & H.Z. Movat: The role of smooth muscle cells in the fibrogenesis of arteriosclerosis. *Amer. J. Path.* 1960, 37: 377-390. (23, 56).
- Haust, M.D., R.H. More, S.A. Bencosme & J.U. Balis: Elastogenesis in human aorta: an electron microscopic study. *Exp. molec. Path.* 1965, 4: 598-524. (83).
- Haust, M.D.: Fine fibrils of extracellular space (microfibrils). Their structure and role in connective tissue organization. *Amer. J. Path.* 1965, 47: 1113-1138. (86).
- Haust, M.D. & R.H. More: Electron microscopy of connective tissues and elastogenesis. B.M. Wagner & D.E. Smith: International Academy of Pathology. Monograph No. 7. The connective tissues. Baltimore: The Williams & Wilkins Co. 1967, pp. 352-376. (83, 86).
- Haust, M.D.: Injury and repair in the pathogenesis of atherosclerotic lesions. R.J. Jones: Atherosclerosis: Proceedings of the second international symposium. Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1970, pp. 12-20. (54).

- Haust, M.D.: Arteriosclerosis. J.G. Brunson & E.A. Gall: Concepts of disease: a textbook of human pathology. New York, London, Toronto: The MacMillan Co. 1971: pp. 451-487. (23, 26, 87).
- Heck, A.F., M. Hasuo, M. Furuse, M. Brock & H. Dietz: Distribution of serum protein labelled with Evans blue in the walls of extra- and intracranial blood vessels of the cat. Atherosclerosis 1976, 23: 227-238. (58, 63, 76).
- Helin, P. & I. Lorenzen: Arteriosclerosis in rabbit aorta induced by systemic hypoxia. Biochemical and morphologic studies. Angiology 1969, 20: 1-12. (4, 25, 46, 47, 50).
- Helin, P., Lorenzen, I., C. Garbarsch & M.E. Matthiessen: Arteriosclerosis and hypoxia. Part 2. Biochemical changes in mucopolysaccharides and collagen of rabbit aorta induced by systemic hypoxia. J. Atheroscler. Res. 1969, 9: 295-304. (4, 25, 46).
- Helin, P., I. Lorenzen, C. Garbarsch & M.E. Matthiessen: Arteriosclerosis in rabbit aorta induced by noradrenaline. The importance of the duration of the noradrenaline action. Atherosclerosis 1970a, 12: 125-132. (4, 41, 44, 46, 50).
- Helin, G., P. Helin & I. Lorenzen: The aortic glycosaminoglycans in arteriosclerosis induced by systemic hypoxia. Atherosclerosis 1970b, 12: 235-240. (4).
- Helin, P., I. Lorenzen, C. Garbarsch & M.E. Matthiessen: Repair in arterial tissue. Morphological and biochemical changes in rabbit aorta after a single dilatation injury. Circulat. Res. 1971a, 29: 542-554. (4, 26, 27, 28, 29, 46, 60, 65, 69, 78, 84).
- Helin, P., I. Lorenzen, C. Garbarsch & M.E. Matthiessen: Arteriosclerosis in rabbit aorta induced by mechanical dilatation. Biochemical and morphological studies. Atherosclerosis 1971b, 13: 319-331. (4, 26, 27, 28, 46, 84).
- Helin, P., C. Garbarsch, T. Mørk Hansen, G. Helin, B. Kofod & I. Lorenzen: Effect of hypoxia on the connective tissue of aorta and skin in rabbits. Atherosclerosis 1974, 19: 201-214. (4, 25).
- Helin, P., C. Garbarsch & I. Lorenzen: Effects of intermittent and continuous hypoxia on the aortic wall in rabbits. Analyses of glycosaminoglycans, hydroxyproline and vascular histochemistry. Atherosclerosis 1975, 21: 325-335. (4, 25).

- Helin, P.: Arterievæggens reaktion på beskadigelse. En biochemisk undersøgelse af glykosaminoglykaner og kollagen i kanin-aorta. Thesis. København 1977. (27, 29, 44, 46, 60, 78, 83, 84).
- Heptinstall, R.H. & K.A. Porter: The effect of a brief period of high blood pressure on cholesterol-induced atheroma in rabbits. Brit. J. exp. Path. 1957, 38: 55-61. (25).
- Heptinstall, R.H., H. Barkley & K.A. Porter: The relative roles of blood cholesterol level and blood pressure level in the production of experimental aortic atheroma in rabbits. Angiology 1958, 9: 84-87. (25).
- Hill, M.C.: Various forms of experimental arterial disease in the rabbit. Arch. intern. Med. 1910, 5: 22-29. (26).
- Hinek, A. & J. Thyberg: Electron microscopic observations on the formation of elastic fibers in primary cultures of aortic smooth muscle cells. J. Ultrastruct. Res. 1977, 60: 12-20. (56, 86).
- Hirsch, E.Z. & A.L. Robertson, Jr.: Selective acute arterial endothelial injury and repair. I. Methodology and surface characteristics. Atherosclerosis 1977, 28: 271-287. (25, 32, 37, 55, 59, 81).
- Hoff, H.F. & R. Gottlob: A fine structure study of injury to the endothelial cells of the rabbit abdominal aorta by various stimuli. Angiology 1967, 18: 440-451. (47).
- Hueper, W.C.: Pathogenesis of arteriosclerosis. Amer. J. clin. Path. 1956, 26: 559-578. (3).
- Humphrey, W.J.: Drying soft biological tissue for scanning electron microscopy. O. Johari & I. Corvin: Scanning electron microscopy. Chicago: ITT Research Institute 1975, pp. 707-713. (9).
- Hüttner, I., R.H. More & G. Rona: Fine structural evidence of specific mechanism for increased endothelial permeability in experimental hypertension. Amer. J. Path. 1970, 61: 395-412. (59).
- Hüttner, I., M. Boutet & R.H. Möre: Gap junctions in arterial endothelium. J. Cell Biol. 1973, 57: 247-252. (82).

- Imai, H., K.J. Lee, S.K. Lee, K.T. Lee, R.M. O'Neal & W.A. Thomas: Ultrastructural features of aortic cells in mitosis in control and cholesterol-fed swine. *Lab. Invest.* 1970, 23: 401-415. (4).
- Imparato, A.M., F.G. Baumann, J. Pearson, G.E. Kim, T. Davidson, I. Ibrahim & I. Nathan: Electron microscopic studies of experimentally produced fibromuscular arterial lesions. *Surg. Gynec. Obstet.* 1974, 139: 497-504. (88).
- Jennings, M.A., V.T. Marchesi & Florey, H.: The transport of particles across the walls of small blood vessels. *Proc. roy. Soc. B.* 1962, 156: 14-19. (60).
- Josué, O.: Athérome aortique expérimental par injections répétées d'adrénaline dans les veines. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 1903, 55: 1374-1376. (3, 25, 46).
- Josué, O.: Contribution a l'étude histologique de l'athérome artériel. *J. Physiol. (Paris)* 1905, 7: 690-699. (3, 25, 46).
- Jørgensen, L., M.A. Packham, H.C. Rowsell & J.F. Mustard: Deposition of formed elements of blood on the intima and signs of intimal injury in the aorta of rabbits, pig and man. *Lab. Invest.* 1972, 27: 341-350. (24).
- Kadar, A., B. Veress & H. Jellinek: Ultrastructural elements in experimental intimal thickening. II. Study of the development of elastic elements in intimal proliferation. *Exp. molec. Path.* 1969, 11: 212-223. (26, 83, 86).
- Kadar, A., D.L. Gardner & V. Busch: The relation between the fine structure of smooth-muscle cells and elastogenesis in the chick-embryo aorta. *J. Path.* 1971, 104: 253-260. (83).
- Kadar, A., D.L. Gardner & V. Busch: Glykosaminoglycans in developing chick-embryo aorta revealed by ruthenium red: an electron-microscope study. *J. Path.* 1972, 108: 275-280. (83).
- Karrer, H.E. & J. Cox: An electron microscope study of the aorta in young and in ageing mice. *J. Ultrastruct. Res.* 1961, 5: 1-27. (86).
- Katsuda, S. & K. Kajikawa: Elastogenesis in experimental arteriosclerosis of rabbits. *J. Electron Microsc.* 1977, 26: 111-119. (83, 86, 87, 88).

- Katz, L.N. & J. Stamler: Cholesterol-induced atherosclerosis. P. György, L. Leiter & S.O. Waife: Experimental atherosclerosis. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas 1953, pp. 127-130. (25).
- Katz, L.N. & R. Pick: The hormonal regulation of lipid metabolism and its etiological significance. H.T. Blumenthal: Cowdry's arteriosclerosis. A survey of the problem. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas 1967, pp. 459-473. (25).
- Kelly, F.B. jr., C.B. Taylor & G.M. Hass: Experimental atherosclerosis. Localization of lipids in experimental arterial lesions of rabbits with hypercholesterolemia. Arch. Path. 1952, 53: 419-436. (25).
- Kirkpatrick, J.B.: Pathogenesis of foam cell lesions in irradiated arteries. Amer. J. Path. 1967, 50: 291-310. (26).
- Kjeldsen, K., P. Astrup & J. Wanstrup: Ultrastructural intimal changes in the rabbit aorta after a moderate carbon monoxide exposure. Atherosclerosis 1972, 16: 67-82. (48).
- Klynstra, F.B. & C.J.F. Böttcher: Permeability patterns in pig aorta. Atherosclerosis 1970, 11: 451-462. (83).
- Knieriem, H.-J., G. Bondjers & S. Björkerud: Electron microscopy of intimal plaques following induction of large superficial mechanical injury (transverse injury) in the rabbit aorta. Virchows Arch. Abt. A 1973, 359: 267-282. (56, 87).
- Kobayashi, T.: Fine structure of arteriosclerosis induced in rabbit aorta by epinephrine and thyroxine. Acta path. microbiol. scand. 1969, 76: 193-292. (47).
- Kunz, J., B. Schreiter, B. Schubert, K. Voss & K. Krieg: Experimentelle Untersuchungen über die Regeneration der Aortenendothelzellen. Automatische und visuelle Auswertung von Autoradiogrammen. Acta histochem. (Jena) 1978, 61: 53-63. (16).
- Lange, F.: Studien zur Pathologie der Arterien, insbesondere zur Lehre von der Arteriosklerose. Virchows Arch. path. Anat. 1924, 248: 463-556. (3, 25, 26, 46).
- Lautsch, E.V., G.C. McMillan & G.L. Duff: Technics for the study of the normal and atherosclerotic arterial intima from its endothelial surface. Lab. Invest. 1953, 2: 397-407. (7, 36).
- Leary, T.: The genesis of atherosclerosis. Arch. Path. 1941, 32: 507-555. (25).

- Lee, K.T., J. Jarmolych, D.N. Kim, C. Grant, J.A. Krasney, W.A. Thomas & A.M. Bruno: Production of advanced coronary atherosclerosis, myocardial infarction and "sudden death" in swine. *Exp. molec. Path.* 1971, 15: 170-190. (25).
- Levene, C.I.: The early lesions of atheroma in the coronary arteries. *J. Path. Bact.* 1956a, 72: 79-83. (26).
- Levene, C.I.: The pathogenesis of atheroma of the coronary arteries. *J. Path. Bact.* 1956b, 72: 83-86. (26).
- Lewis, E.R. & M.K. Nemanic: Critical point drying technique. O. Johari & I. Corvin: Scanning electron microscopy. Chicago: ITT Research Institute 1973, pp. 767-774. (9).
- Lindy, S., H. Turto, J. Uitto, P. Helin & I. Lorenzen: Injury and repair in arterial tissue in the rabbit. Analyses of DNA, RNA, hydroxyproline, and lactate dehydrogenase in experimental arteriosclerosis. *Circulat. Res.* 1972, 30: 123-130. (4).
- Lorenzen, I.: Epinephrine-induced alterations in connective tissue of aortic wall in rabbits. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 1959, 102: 440-442. (4, 46, 50).
- Lorenzen, I.: Repair processes in arterial tissue. Biochemical alterations in rabbit aorta induced by norepinephrine. *Circulat. Res.* 1963a, 12: 449-454. (4, 25, 44, 46, 47, 50).
- Lorenzen, I.: Experimental arteriosclerosis. Biochemical and morphological changes induced by adrenaline and thyroxine. Thesis. Copenhagen: Munksgaard 1963b. (4, 25, 44, 46, 50).
- Lorenzen, I.: Injury and repair in vascular connective tissue. E. Kulonen & I. Pekkarainen: Biology of the fibroblast. London, New York: Academic Press 1973, pp. 601-614. (4, 46).
- Mackenzie, D.C. & J. Loewenthal: Endothelial growth in nylon vascular grafts. *Brit. J. Surg.* 1960-61, 48: 212-217. (32).
- Majno, G. & G.E. Palade: Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J. biophys. biochem. Cytol.* 1961, 11: 571-606. (47, 60).
- Majno, G.: Ultrastructure of the vascular membrane. W.F. Hamilton: Circulation, Vol. III. In: P. Dow: Handbook of physiology. Washington D.C. 1965, pp. 2293-2375. (55, 69, 88).

Marchand, F.: Über Arteriosklerose (Athero-Sklerose).

E. v. Leiden & E. Pfeiffer: Verhandl. d. Kongr. f. Inn. Med.,
21. Kongr., Leipzig 1904. Wiesbaden 1904, pp. 23-59. (46).

McGill, H.C., Jr., J.C. Geer & R.L. Holman: Sites of vascular vulnerability in dogs demonstrated by Evans blue. Arch. Path.
1957, 64: 303-311. (24, 58, 59, 60, 76).

McGill, H.C. jr., M.H. Frank & J.C. Geer: Aortic lesions in hypertensive monkeys. Arch. Path. 1961, 71: 96-102. (25).

McGill, H.C., jr.: Atherosclerosis: problems in pathogenesis.

R. Paoletti & A.M. Gotto, jr.: Atherosclerosis Reviews, Vol. 2.
New York: Raven Press 1977, pp. 27-65. (26, 54).

McManus, J.F.A. & R.W. Mowry: Staining methods. Histologic and histochemical. New York: Harper & Row 1964, 74, 126-128, 239-240. (63).

Minick, C.R., G.E. Murphy & W.G. Campbell, jr.: Experimental induction of athero-arteriosclerosis by the synergy of allergic injury to arteries and lipid-rich diet. I. Effect of repeated injections of horse serum in rabbits fed a dietary cholesterol supplement. J. exp. Med. 1966, 124: 635-652. (54).

Moon, H.D.: Coronary arteries in fetuses, infants, and juveniles. Circulation 1957, 16: 263-267. (26).

Moon, H.D.: Connective tissue reactions in the development of arteriosclerosis. I.H. Page: Connective tissue, thrombosis and atherosclerosis. New York, London: Academic Press 1959, pp. 33-38. (4).

Moore, D.H. & H. Ruska: The fine structure of capillaries and small arteries. J. biophys. biochem. Cytol. 1957, 3: 457-462. (60).

Moore, R.D. & M.D. Schoenberg: The relations of mucopolysaccharides of vessel walls to elastic fibres and endothelial cells. J. Path. Bact. 1959, 77: 163-169. (84).

Moore, S., Friedman, R.J., D.P. Singal, J. Gauldie, M.A. Blajchman & R.S. Roberts: Inhibition of injury induced thrombo-atherosclerotic lesions by anti-platelet serum in rabbits. Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.) 1976, 35: 70-81. (24).

Mosher, D.F. & A. Vaheri: Thrombin stimulates the production and release of a major surface-associated glycoprotein (fibronectin) in cultures of human fibroblasts. Exp. Cell Res. 1978, 112: 323-334. (88).

- Moskalewski, S., M. Konwinski & A. Hinek: In vitro elastic fiber formation by aggregated aortic cells of newborn rabbits. *Anatomy and Embryology* 1976, 150: 113-122. (56, 86).
- Moss, A.J., S.L. Minken, P. Samuelson & C. Angell: Effects of exogenous and endogenous norepinephrine on the oxygen availability of intact muscular arteries. *J. Atheroscler. Res.* 1969, 10: 11-18. (47).
- Movat, H.Z., R.H. More & M.D. Haust: The diffuse intimal thickening of the human aorta with ageing. *Amer. J. Path.* 1958, 34: 1023-1032. (26).
- Muir, A.R. & A. Peters: Quintuple-layered membrane junctions at terminal bars between endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1962, 12: 443-448. (59).
- Mönckeberg, J.G.: Über die reine Mediaverkalkung der Extremitätsarterien und ihr Verhalten zur Arteriosklerose. *Virchows Arch. path. Anat.* 1903, 171: 141-167. (27, 46).
- Nelson, E., T. Sunaga, T. Shimamoto, J. Kawamura, M.L. Rennels & R. Hebel: Ischemic carotid endothelium. Scanning electron microscopical studies. *Arch. Path.* 1975, 99: 125-131. (48).
- Nemanic, M.K.: Critical point drying, cryofracture, and serial sectioning. O. Johari & I. Corvin: Scanning electron microscopy. Chicago: ITT Research Institute 1972, pp. 297-304. (9).
- Nielsen, M.H. & N.C. Nielsen: Spektrophotometric determination of Evans blue dye in plasma with individual correction for blank density by a modified Gaeblers method. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 1962, 14: 605-617. (62).
- Oester, Y.T.: Adrenal medullary hormones and arteriosclerosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1959, 72: 885-896. (25, 46, 47).
- Okuneff, N.: Über die vitale Farbstoffimibition der Aortenwand. *Virchows Archiv path. Anat.* 1926, 259: 685-697. (24, 57, 58).
- Otto, C.: Über Arteriosklerose bei Tieren und ihr Verhältniss zur menschlichen Arteriosklerose. *Virchows Arch. path. Anat.* 1911, 203: 352-404. (25).
- Packham, M.A., H.C. Rowsell, L. Jørgensen & J.F. Mustard: Localized protein accumulation in the wall of the aorta. *Exp. molec. Path.* 1967, 7: 214-232. (24, 58, 76).

- Palade, G.E.: Blood capillaries of the heart and other organs. *Circulation* 1961, 24: 368-384. (60).
- Parker, F. & G.F. Odland: A correlative histochemical, biochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rabbit aorta with special reference to the myo-intimal cell. *Amer. J. Path.* 1966, 48: 197-239. (25).
- Pearse, A.G.E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*, Third edition, vol. 1. London: J. & A. Churchill 1968, pp. 579. (28), 666. (63).
- Pearse, A.G.E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Third edition, vol. 2. Edinburgh, London: Churchill Livingstone 1972, pp. 1138-1140. (63).
- Pease, D.C. & S. Molinari: Electron microscopy of muscular arteries; pial vessels of the cat and monkey. *J. Ultrastruct. Res.* 1960, 3: 447-468. (84, 88).
- Pease, D.C. & W. J. Paule: Electron microscopy of elastic arteries; the thoracic aorta of the rat. *J. Ultrastruct. Res.* 1960, 3: 469-483. (83, 86).
- Peine, C.J. & F.N. Low: Scanning electron microscopy of cardiac endothelium of the dog. *Amer. J. Anat.* 1975, 142: 137-158. (21).
- Petroff, J.R.: Über die Vitalfärbung der Gefässwandungen. *Beitr. path. Anat.* 1923, 71: 115-131. (57).
- Poole, J.C.F., A.G. Sanders & H.W. Florey: The regeneration of aortic endothelium. *J. Path. Bact.* 1958, 75: 133-143. (19, 25, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 55, 63, 77).
- Poole, J.C. F. & H. W. Florey: Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits. *J. Path. Bact.* 1958, 75: 245-252. (37).
- Poole, J.C.F., A.G. Sanders & H.W. Florey: Further observations on the regeneration of aortic endothelium in the rabbit. *J. Path. Bact.* 1959, 77: 637-638. (32, 34, 35, 36, 38).
- Poole, J.C.F., D.C. Sabiston, jr., H.W. Florey & P.R. Allison: Growth of endothelium in arterial prosthetic grafts and following endarterectomy. *Surg. Forum* 1962, 13: 225-227. (32, 38).
- Poole, J.C.F.: Regeneration of aortic tissues in fabric grafts of the aorta. *Symposia of the zoological society of London* 1964, 11: 131-140. (32).

- Poole, J.C.F., S.B. Cromwell & E.P. Benditt: Behavior of smooth muscle cells and formation of extracellular structures in the reaction of arterial walls to injury. *Amer. J. Path.* 1971, 62: 391-414. (26, 55, 56, 87).
- Porter, K.R., D. Kelley & P.M. Andrews: The preparation of cultured cells and soft tissues for scanning electron microscopy. *Proceedings of the fifth Annual Stereoscan Scanning Electron Microscope Colloquium*. Kent Cambridge Scientific Inc., Morton Grove Ill. 1972, pp. 1-19. (8, 9).
- Prior, J.T. & D.B. Jones: Structural alterations within the aortic intima in infancy and childhood. *Amer. J. Path.* 1952, 28: 937-951. (26).
- Prior, J.T. & R.V.P. Hutter: Intimal repair of the aorta of the rabbit following experimental trauma. *Amer. J. Path.* 1955, 31: 107-123. (25).
- Pugatch, E.M.J.: The growth of endothelium and pseudoendothelium on the healing surface of rabbit ear chambers. *Proc. roy. Soc. B.* 1964, 160: 412-422. (34, 35, 36, 38).
- Rapola, J. & E. Pesonen: Coronary artery changes in newborn babies. *Acta path. microbiol. scand.* 1977, 85: 286-296. (26, 88).
- Reidy, M.A. & D.E. Bowyer: Scanning electron microscopy of arteries The morphology of aortic endothelium in haemodynamically stressed areas associated with branches. *Atherosclerosis* 1977a, 26: 181-194. (10, 19, 20, 24).
- Reidy, M.A. & D.E. Bowyer: Scanning electron microscopy: morphology of aortic endothelium following injury by endotoxin and during subsequent repair. *Atherosclerosis* 1977b, 26: 319-328. (10, 19, 24, 49).
- Reidy, M.A. & D.E. Bowyer: Scanning electron microscopy of aortic endothelium following injury by endotoxin and during subsequent repair. *Progr. Biochem. Pharmacol.* 1977c, 13: 175-181. (19, 24, 49).
- Robertson, A.L. & P.A. Khairallah: Effects of angiotensin II and some analogues on vascular permeability in the rabbit. *Circulat. Res.* 1972, 31: 923-931. (47).
- Romeis, B.: *Mikroskopische Technik*. München: Leibniz Verlag 1948, p. 167. (63).
- Ross, R. & S.J. Klebanoff: The smooth muscle cell. I. In vivo synthesis of connective tissue proteins. *J. Cell Biol.* 1971, 50: 159-171. (56).

- Ross, R.: The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J. Cell Biol.* 1971, 50: 172-186. (56, 86).
- Ross, R. & J.A. Glomset: Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973, 180: 1332-1339. (5, 23, 27, 54, 55, 56, 85, 89).
- Ross, R. & J.A. Glomset: Studies of primate arterial smooth muscle cells in relation to atherosclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1974, 43: 265-278. (5, 23, 26, 27, 54, 56, 89).
- Ross, R. & L. Harker: Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 1976, 193: 1094-1100. (4, 5, 23, 24, 25, 26, 27, 34, 54, 55, 56).
- Rowsell, H.C., H.G. Downie & J.F. Mustard: Comparison of the effect of egg yolk or butter on the development of atherosclerosis in swine. *Canad. med. Ass. J.* 1960, 83: 1175-1186. (25).
- Rutherford, R.B. & R. Ross: Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate. *J. Cell Biol.* 1976, 69: 196-203. (55).
- Schaper, J., M. Borgers & W. Schaper: Ultrastructure of ischemia-induced changes in the precapillary anastomotic network of the heart. *Amer. J. Cardiol.* 1972, 29: 851-859. (88).
- Schlichter, J.G., L.N. Katz & J. Meyer: The occurrence of atheromatous lesions after cauterization of the aorta followed by cholesterol administration. *Amer. J. Med. Sci.* 1949, 217-218: 603-609. (25).
- Schornagel, H.E.: Intimal thickening in the coronary arteries in infants. *Arch. Path.* 1956, 62: 427-432. (26).
- Schwartz, S.M. & E.P. Benditt: Postnatal development of the aortic subendothelium in rats. *Lab. Invest.* 1972a, 6: 778-786. (84, 87, 88).
- Schwartz, S.M. & E.P. Benditt: Studies on aortic intima. I. Structure and permeability of rat thoracic aortic intima. *Amer. J. Path.* 1972b, 66: 241-264. (59, 60, 82).
- Schwartz, S.M., M.B. Stemerman & E.P. Benditt: The aortic intima. II. Repair of aortic lining after mechanical denudation. *Amer. J. Path.* 1975, 81: 15-42. (26, 35, 55, 56, 57, 82).

- Schwarz, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Bildung der elastischen Membranen in der embryonalen Aorta des Menschen. *Verh. Anat. Ges. Erg. H.z. Anat. Anz.* 1959, 106/107: 308-319. (56).
- Seifert, K.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Aorta des Kaninchens. *Z. Zellforsch.* 1963, 60: 293-312. (70, 88).
- Shimamoto, T. & T. Sunaga: Edematous arterial reaction by adrenaline and cholesterol and its prevention by MAO inhibitor observed by electron microscopic technique. *Japanese heart journal* 1962, 3: 581-601. (47).
- Shimamoto, T., Y. Yamashita & T. Sunaga: Scanning electron microscopic observation of endothelial surface of heart and blood vessels. The discovery of intercellular bridges of vascular endothelium. *Proceedings of the Japan Academy* 1969a, 45: 507-511. (5, 16, 17).
- Shimamoto, T., Y. Yamashita, F. Numano & T. Sunaga: The endothelial cell damages of pre-atheromatous and atheromatous lesions observed by scanning electron microscope. *Proceedings of the Japan Academy* 1969b, 45: 761-766. (5, 16, 17).
- Shimamoto, T.: An introduction to the investigation of atherogenesis, thrombogenesis and pyridinolcarbamate treatment. Visualization of the transendothelial passage through intercellular junctions and discovery of endothelial folds and intercellular bridges of vascular endothelium. T. Shimamoto & F. Numano: *Atherogenesis*. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation 1969, pp. 5-27. (17).
- Shimamoto, T., Y. Yamashita, F. Numano & T. Sunaga: Scanning and transmission electron microscopic observation of endothelial cells in the normal condition and in initial stages of atherosclerosis. *Acta path. jap.* 1971, 21: 93-119. (16, 47)
- Sholley, M.M., M.A. Gimbrone & R.S. Cotran: Cellular migration and replication in endothelial regeneration. A study using irradiated endothelial cultures. *Lab. Invest.* 1977, 36: 18-25. (37, 55, 56).
- Simionescu, N. & M. Simionescu: Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. I. Procedure, and evidence for mordanting effect. *J. Cell Biol.* 1976a, 70: 608-621. (64, 70).

- Simionescu, N. & M. Simionescu: Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. II. The moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect. *J. Cell Biol.* 1976b, 70: 622-633. (64, 70).
- Sinapius, D.: Über das Aortenendothel. *Virchows Arch. path. Anat.* 1952, 322: 662-694. (7, 19, 33, 35, 36).
- Sinapius, D.: Über Grundlagen und Bedeutung der Vorversilberung und verwandter Methoden nach Untersuchungen am Aortenendothel. *Z. Zellforsch.* 1956, 44: 27-56. (7, 8, 10, 19, 33, 37).
- Singer, I.I.: The fibronexus: a transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5 nm microfilaments in hamster and human fibroblasts. *Cell* 1979, 16: 675-685. (88).
- Smith, U., J.W. Ryan, D.D. Michie & D.S. Smith: Endothelial projections as revealed by scanning electron microscopy. *Science* 1971, 173: 925-927. (20).
- Somer, J.B. & C.J. Schwartz: Focal ^3H -cholesterol uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* 1971, 13: 293-304. (24, 76).
- Somer, J.B. & C.J. Schwartz: Focal (^3H) cholesterol uptake in the pig aorta. Part 2. Distribution of (^3H) cholesterol across the aortic wall in areas of high and low uptake in vivo. *Atherosclerosis* 1972, 16: 377-388. (24, 76).
- Somer, J.B., G. Evans & C.J. Schwartz: Influence of experimental aortic coarctation on the pattern of aortic Evans blue uptake in vivo. *Atherosclerosis* 1972, 16: 127-133. (59, 76).
- Somer, J.B., F.P. Bell & C.J. Schwartz: Focal differences in lipid metabolism of the young pig aorta. Synthesis from ($1\text{-}^{14}\text{C}$) acetate and ($\text{U-}^{14}\text{C}$) glucose in vitro. *Atherosclerosis* 1974, 20: 11-21. (24, 76).
- Spaet, T.H., M.B. Stemerman, F.J. Veith & I. Lejnieks: Intimal injury and regrowth in the rabbit aorta. Medial smooth muscle cells as a source of neointima. *Circulat. Res.* 1975, 36: 58-70. (26, 35, 56).
- Ssolowjew, A.: Experimentelle Untersuchungen über die Heilungsvorgänge in der Arterienwand. *Beitr. path. Anat.* 1929, 83: 485-500. (26).
- Ssolowjew, A.: Über experimentell hervorgerufene Elasticarisse der Arterien und deren Bedeutung für die Lipoidablagerung. *Virchows Arch. path. Anat.* 1932, 283: 213-230. (25).

- Stachelberger, H., H. Redl., F. Ring & H. Sinzinger: Some remarks on arterial tissue preparation for SEM. *Progr. biochem. Pharmacol.* 1977, 13: 196-202. (8, 9, 16).
- Stehbens, W.E.: The production of sulphated mucopolysaccharides by endothelium. *J. Path. Bact.* 1962, 83: 337-345. (84).
- Stehbens, W.E.: Endothelial cell mitosis and permeability. *Quart. J. exp. Physiol.* 1965, 50: 90-92. (59).
- Stehbens, W.E.: Experimental arteriovenous fistulae in normal and cholesterol-fed rabbits. *Pathology* 1973, 5: 311-324. (25).
- Stehbens, W.E.: The role of hemodynamics in the pathogenesis of atherosclerosis. *Progr. cardiovasc. Dis.* 1975, 18: 89-103. (24).
- Stehbens, W.E.: Endothelial permeability in experimental aneurysms and arteriovenous fistulas in rabbits as demonstrated by the uptake of Evans blue. *Atherosclerosis* 1978, 30: 343-349. (58).
- Stein, O. & Y. Stein: An electron microscopic study of the transport of peroxidases in the endothelium of mouse aorta. *Z. Zellforsch.* 1972, 133: 211-222. (59).
- Steinwall, O. & I. Klatzo: Selective vulnerability of the blood-brain barrier in chemically induced lesions. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1966, 25: 542-559. (58, 61, 63, 76).
- Stemerman, M.B. & R. Ross: Experimental arteriosclerosis. I. Fibrous plaques formation in primates, an electron microscope study. *J. exp. Med.* 1972, 136: 769-789. (4, 26, 35, 54, 56, 79).
- Stemerman, M.B., T.H. Spaet, F. Pitlick, J. Cintron, I. Lejnieks & M.L. Tiell: Intimal healing. The pattern of reendothelialization and intimal thickening. *Amer. J. Path.* 1977, 87: 125-142. (26, 35, 38, 55, 56, 57, 59, 76, 81).
- Stief, A. & L. Tokay: Further contributions to the histopathology of experimental adrenalin intoxication. *J. nerv. ment. Dis.* 1935, 81: 633-648. (47).
- Still, W.J.S.: The pathogenesis of intimal thickenings produced by hypertension in large arteries in the rat. *Lab. Invest.* 1968, 19: 84-91. (37).
- Still, W.J.S. & S. Dennison: The arterial endothelium of the hypertensive rat. *Arch. Path.* 1974, 97: 337-342. (8, 18, 37).

- Studer, A. & H.P. Lorez: Spätveränderungen nach Überdehnung der Aorta abdominalis des Kaninchens bei gleichzeitiger distaler Stenosierung. *Path. Microbiol.* 1967, 30: 129-138. (26).
- Sunaga, T., Y. Yamashita & T. Shimamoto: The intercellular bridge of vascular endothelium. The presence of two types of bridges of endothelial surface. *Proceedings of the Japan Academy* 1969a, 45: 627-631. (5, 16, 17).
- Sunaga, T., Y. Yamashita & T. Shimamoto: Epinephrine effect on arterial endothelial cells observed by scanning electron microscope. *Processings of the Japan Academy.* 1969b, 45: 808-813. (5, 16, 17, 47, 48).
- Sunaga, T., T. Shimamoto & E. Nelson: Correlated scanning and transmission electron microscopy of arterial endothelium. O. Johari & I. Corvin: *Scanning electron microscopy.* Chicago: ITT Research Institute 1973, pp. 459-463. (17).
- Svendsen, E. & L. Jørgensen: Focal "spontaneous" alterations and loss of endothelial cells in rabbit aorta. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A* 1978, 86: 1-13. (24).
- Swinehart, P.A., D.L. Bentley & K.V. Kardong: Scanning electron microscopic study of the effects of pressure on the luminal surface of the rabbit aorta. *Amer. J. Anat.* 1976, 145: 137-142. (8, 18).
- Taylor, C.B., D. Baldwin & G.M. Hass: Localized arteriosclerotic lesions induced in the aorta of the juvenile rabbit by freezing. *Arch. Path.* 1950, 49: 623-640. (25, 26).
- Taylor, C.B.: The reaction of arteries to injury by physical agents with a discussion of arterial repair and its relationship to atherosclerosis. In: *Symposion on atherosclerosis*, 22-23 March 1954, Washington, National Academy of Sciences - National Research Council 1954, pp. 74-90. (25, 26).
- Thomas, W.A., R.A. Florentin, S.C. Nam, D.N. Kim, R.M. Jones & K.T. Lee: Preproliferative phase of atherosclerosis in swine fed cholesterol. *Arch. Path.* 1968, 86: 621-643. (4).
- Tiell, M.L., M.B. Stemerman & T.H. Spaet: The influence of the pituitary on arterial intimal proliferation in the rat. *Circulat. Res.* 1978, 42: 644-649. (24, 26).

- Tokunaga, J., M. Osaka & T. Fujita: Endothelial surface of rabbit aorta as observed by scanning electron microscopy. *Archivum histologicum japonicum* 1973, 36: 129-141. (20).
- Velican, C. & D. Velican: Intimal thickening in developing coronary arteries and its relevance to atherosclerotic involvement. *Atherosclerosis* 1976, 23: 345-355. (26).
- Veress, B., A. Kadar & H. Jellinek: Ultrastructural elements in experimental intimal thickening. I. Electron microscopic study of the development and cellular elements of intimal proliferation. *Exp. molec. Path.* 1969, 11: 200-211. (26, 55).
- Virchow, R.: *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*. Frankfurt a.M.: Verlag von Meidinger Sohn & Comp. 1856, pp. 496-506. (3, 54).
- Vlodaver, Z. & H.N. Neufeld: The musculo-elastic layer in the coronary arteries. *Vasc. Dis.* 1967, 4: 136-145. (26).
- Vracko, R. & E.P. Benditt: Capillary basal lamina thickening. Its relationship to endothelial cell death and replacement. *J. Cell Biol.* 1970, 47: 281-285. (84).
- Weber, G.: Processing with arterial tissues for SEM examinations. *Progr. biochem. Pharmacol.* 1977, 13: 185-186. (8).
- Webster, W.S., S.P. Bishop & J.C. Geer: Experimental aortic intimal thickening. I. Morphology and source of intimal cells. *Amer. J. Path.* 1974a, 76: 245-264. (26, 38, 55, 56, 81).
- Webster, W.S., S.P. Bishop & J.C. Geer: Experimental aortic intimal thickening. II. Endothelialization and permeability. *Amer. J. Path.* 1974b, 76: 265-284. (26, 38, 55, 56, 59, 81).
- Weibel, E.R. & G.E. Palade: New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J. Cell Biol.* 1964, 23: 101-112. (72).
- Wight, T.N. & R. Ross: Proteoglycans in primate arteries. I. Ultrastructural localization and distribution in the intima. *J. Cell Biol.* 1975, 67: 660-674 (23, 56, 60, 83).
- Wissler, R.W., L.E. Frazier, R.H. Hughes & R.A. Rasmsusen: Atherogenesis in the Cebus monkey. I. A comparison of three food fats under controlled dietary conditions. *Arch. Path.* 1962, 74: 312-322. (25).

- Wissler, R.W.: The arterial medial cell, smooth muscle or multi-functional mesenchyme? J. Atheroscler. Res. 1968, 8: 201-213. (23, 56).
- Wolinsky, H. & S. Glagov: Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. Circulat. Res. 1967, 20: 409-421. (18, 23).
- Wolinsky, H.: Mesenchymal response of the blood vessel wall. A potential avenue for understanding and treating atherosclerosis. Circulat. Res. 1973, 32: 543-549. (23, 56).
- Wright, H.P., M. Evans & R.P. Green: Aortic endothelial mitosis and Evans blue uptake in cholesterol-fed subscorbatic guinea-pigs. Atherosclerosis 1975, 21: 105-113. (24).
- Yamamoto, I.: An electron microscope study of rabbit arterial wall. Smooth muscle and the intercellular components with special reference to the elastic fiber. Journal of electron-microscopy 1962, 11: 212-225. (70, 83, 86, 88).
- Yu, S.Y. & H.T. Blumenthal: The calcification of elastic fiber. Part 4. Epinephrine and beta-aminopropionitrile-induced calcification in animal aortas. J. Atheroscler. Res. 1965, 5: 159-173. (25, 46).
- Zahn, F.W.: Untersuchung über die Vernarbung von Querrissen der Arterienintima und Media nach vorheriger Umschnürung. Arch. path. Anat. 1884, 96 (Neunte Folge Bd. VI): 1-15. (18, 25, 32, 33).
- Zinner, G. & R. Gottlob: Weitere Beobachtungen zur pathologischen Histologie der Venenendothelien. Virch. Arch. path. Anat. 1961, 334: 337-341. (48, 49).

